

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUACIÓN DEL EFECTO TÓXICO DEL CONJUNTO CRISTAL
PARASPORAL-ACEITE ESENCIAL EN LA “MOSCA MEXICANA DE LA
FRUTA”, *Anastrepha ludens* L. (Diptera: Tephritidae)

POR

SAMUEL BUENTELLO WONG

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

AGOSTO, 2016

EVALUACIÓN DEL EFECTO TÓXICO DEL CONJUNTO CRISTAL
PARASPORAL-ACEITE ESENCIAL EN LA “MOSCA MEXICANA DE LA
FRUTA”, *Anastrepha ludens* L. (Diptera: Tephritidae)



Comité de Tesis

Dr. Luis J. Galán Wong
Director de Tesis

Dra. Lilia H. Morales Ramos
Secretario

Dra. Katiushka Arévalo Niño
Vocal

Dr. Hugo Alberto Luna Olvera
Vocal

Dr. Benito Pereyra Alférez
Vocal



ESTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO EN EL LABORATORIO 8 DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. LUIS J. GALÁN WONG.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por el financiamiento mediante el otorgamiento de la beca de doctorado.

Al Dr. Luis J. Galán Wong por ser un guía excelente durante mi formación académica, pero más aún por su amistad y consejos de vida invaluable.

A la Dra. Katiushka Arévalo Niño por su gran ayuda y asesoramiento para la realización de los bioensayos con la Mosca Mexicana de la fruta.

A la Dra. Guadalupe Rojas Verde por su asesoramiento durante el transcurso del proyecto, así como a la Dra. Lilia H. Morales Ramos, el Dr. Hugo Alberto Luna Olvera y el Dr. Benito Pereyra Alférez que integran mi comité tutorial.

A la Dra. Verónica Almaguer Cantú por permitirme hacer uso de sus equipos y laboratorio, y por su invaluable ayuda en las etapas iniciales del proyecto.

Al Dr. Hamlet Avilés Arnaut por proporcionarme amablemente las cuatro cepas de referencia de la colección HD de *Bacillus thuringiensis*.

Al técnico de laboratorio Isela Miroslava Mendoza García por su invaluable ayuda durante la realización de la tesis.

A la Dra. Adriana E. Flores Suárez por la revisión crítica del manuscrito para la publicación del primer artículo científico, y por sus cátedras excepcionales sobre toxicología de insectos, las cuales fueron imprescindibles para la realización de este proyecto.

DEDICATORIAS

"Se me considera uno de los trabajadores más dedicados y si el pensamiento es un equivalente de la tarea quizá lo soy, pues a él he consagrado casi todas mis horas de vigilia. Pero si el trabajo se interpreta como un rendimiento determinado durante un tiempo específico de acuerdo con una regla rígida, entonces puede que yo haya sido el peor de los haraganes".

Nikola Tesla (1856 – 1943)

Mi primer dedicatoria es para mi madre Laurentina Wong y a mi padre Ponciano Buentello quienes siempre me han apoyado y motivado a cumplir mis metas, por ser excelentes padres y guías en mi vida, de tal manera que nunca pude haber realizado todo sin ellos, también por supuesto a mis hermanos quienes han sido a la vez mis amigos, compañeros, y maestros de la escuela de la vida: Sebastián, Leonel, Gabriel y Arturo.

A Zanya Tamara por ser parte de mi vida durante esta etapa, y de las etapas venideras, por creer en mí en los momentos de fracaso y frustración, lo cual me impulsó a continuar hasta el final.

A mis amigos, los cuales siempre puedo contar con ellos: Erik, Luis y Sesatty. Compañeros del Instituto los cuales son también mis amigos: Gina, Gaby, Fer, Nora, Mayra, Julian, Emmanuel. También los que estuvieron en el Laboratorio conmigo: Isela, Mónica, Ivonne, Alondra, Erika, German, Gio, Paco, Andrés, Turner y Javi. Mis otros amigos del L4: Esme, Astrid, Hugo, Will, Fátima y Chuy.

A mis primos: Elia, David, Ruth, Chuy, Arturin, Jehú, Mauricio, Silvanita, Yochi, Toto, Mariela y Masiel, quienes también han sido mis amigos durante toda mi vida.

Y por último pero no menos importante quiero dedicar esta tesis a mi abuelo Héctor Wong Guerrero, hombre emprendedor y visionario, que aunque ya no está con nosotros, nos enseñó con su actitud y ejemplo la importancia de la perseverancia y el trabajo para salir adelante en la vida.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIAS.....	ii
TABLA DE CONTENIDO.....	iii
LISTA DE TABLAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
NOMENCLATURA.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS.....	3
3. OBJETIVOS.....	4
3.1 Objetivo general.....	4
3.2 Objetivos particulares.....	4
4. ANTECEDENTES.....	5
4.1 La producción frutícola en México.....	5
4.2 Aspectos generales de la mosca de la fruta	5
4.2.1 Géneros de relevancia de la moscas de la fruta	6
4.2.2 El género <i>Anastrepha</i> en México.....	6
4.2.3 Biología de las moscas de la fruta.....	7
4.2.4 Ciclo biológico.....	7
4.2.5 Descripción de <i>Anastrepha ludens</i>	8
4.2.6 Distribución de <i>Anastrepha ludens</i>	8
4.2.7 Plantas hospederas.....	8
4.3 Manejo integrado de moscas de la fruta.....	9
4.3.1 Generalidades.....	9
4.3.2 Mecanismos de detección.....	10
4.3.3 Muestreo.....	10
4.3.4 Trampeo y uso de atrayentes.....	10
4.3.5 Control legal.....	11
4.3.6 Control mecánico-cultural.....	11
4.3.7 Manipulación del hábitat.....	11
4.3.8 Técnica del insecto estéril.....	12
4.3.9 Control químico.....	12
4.3.10 Métodos alternativos.....	13
4.3.11 Control biológico.....	13
4.3.12 Parasitoides.....	14
4.3.13 Bioplaguicidas.....	15
4.4 Aceites esenciales de plantas usados como Bioinsecticidas.....	18
4.4.1 Aceites esenciales como plaguicidas verdes.....	20
4.4.2 Componentes de los aceites esenciales y su eficacia.....	23

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
4.4.3 Los insecticidas e inhibidores del crecimiento.....	24
4.5 Bacterias patógenas de insectos.....	28
4.5.1 El género <i>Bacillus</i>	30
4.5.2 <i>Bacillus thuringiensis</i> , reseña histórica.....	31
4.5.3 Biología y ciclo de vida.....	32
4.5.4 Familias de toxinas Cry y Cyt.....	35
4.5.5 Modo de acción de las proteínas Cry.....	38
4.5.6 Ecología.....	40
4.5.7 Aplicaciones en Control Biológico.....	42
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
5.1 Caracterización y evaluación de cepas nativas de <i>Bacillus thuringiensis</i> en adultos de <i>Anastrepha ludens</i>	45
5.1.1 Cepas bacterianas.....	45
5.1.2 Aislamiento de cepas nativas bacilos a partir de suelo.....	45
5.1.3 Clasificación basada en la producción de cristal.....	46
5.1.4 Extracción de ADN.....	46
5.1.5 Diseño de cebadores para PCR Múltiple.....	47
5.1.6 Análisis de PCR.....	49
5.1.7 Perfiles de proteínas.....	49
5.1.8 Preparación de los extractos de <i>B. thuringiensis</i> para los bioensayos.....	50
5.1.9 Bioensayos.....	50
5.1.10 Análisis de los datos.....	51
5.2 Caracterización y evaluación de la toxicidad de aceites esenciales de plantas en adultos de la mosca Mexicana de la fruta.....	51
5.2.1 Aceites esenciales (AEs).....	51
5.2.2 Cromatografía de Gases.....	52
5.2.3 Cría de Insectos.....	53
5.2.4 Valoración de la toxicidad por ingestión.....	53
5.2.5 Análisis Estadístico.....	53
5.3 Comparación de la actividad bioinsecticida del conjunto cristales parasporales y los aceites esenciales botánicos en la mosca Mexicana de la fruta.....	54
5.3.1 Solubilización de las proteínas Cry.....	54
5.3.2 Realización de los Bioensayos.....	54
5.3.3 Análisis Estadístico.....	55
5.3.4 Grado de Interacción entre Bioplaguicidas.....	56
6. RESULTADOS.....	57
6.1 Análisis y determinación de la mortalidad de cepas nativas y de referencia de <i>B. thuringiensis</i>	57
6.1.2 Clasificación de las cepas nativas de bacilos a partir de las muestras de suelo.....	57

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
6.1.3 Caracterización molecular de las cepas aisladas mediante PCR.....	58
6.1.4 Bioensayos.....	61
6.2 Análisis y determinación de la mortalidad de varios aceites esenciales de plantas.....	63
6.2.1 Toxicidad por ingestión de diez aceites esenciales.....	63
6.2.2 Análisis cromatográfico de aceites esenciales.....	67
6.3 Comparación de la actividad bioinsecticida del conjunto cristales parasporales y los aceites esenciales botánicos en la mosca Mexicana de la fruta.....	69
7. DISCUSIÓN.....	78
7.1 Clasificación de las cepas nativas de bacilos a partir de las muestras de suelo...	78
7.2 Caracterización molecular de las cepas aisladas mediante PCR.....	79
7.3 Bioensayos con cepas nativas y de referencia de <i>Bacillus thuringiensis</i>	80
7.4 Toxicidad de los Aceites esenciales.....	82
7.5 Análisis de los componentes de 3 Aceites Esenciales.....	84
7.6 Comparación de la actividad bioinsecticida del conjunto cristales parasporales y los aceites esenciales botánicos en la mosca Mexicana de la fruta.....	85
8. CONCLUSIONES.....	88
LITERATURA CITADA.....	89

LISTA DE TABLAS

Sección	Página
Tabla 1.- Productos derivados de plantas que han sido registrados como Bioplaguicidas.....	18
Tabla 2. Aceites esenciales de plantas usados en el presente estudio que muestran actividad insecticida contra Dípteros.....	27
Tabla 3. Especies de bacterias producidas en masa para el control de artrópodos.....	29
Tabla 4. Antecedentes que muestran actividad insecticida de <i>B. thuringiensis</i> contra tefrítidos (Diptera: Tephritidae).....	44
Tabla 5. Secuencia de oligonucleótidos para la amplificación de los genes <i>cry</i> : 2, 4, 10, 11 y 19.....	48
Tabla 6. Clasificación morfológica de las 7 cepas de Bt seleccionadas por PCR.....	59
Tabla 7. Perfiles proteicos de las siete cepas seleccionadas por PCR.....	60
Tabla 8. Evaluación de la toxicidad de proteínas Cry parasporales provenientes de precipitación lactosa/acetona, de cuatro cepas de referencia, registrados al séptimo día de bioensayo.....	62
Tabla 9. Evaluación de la toxicidad de proteínas Cry parasporales solubilizadas provenientes de cuatro cepas de referencia, registrados al séptimo día de bioensayo.....	63
Tabla 10. Resultados de las pruebas de ingestión de los AEs a siete concentraciones diferentes en adultos de <i>Anastrepha ludens</i> registrados al séptimo día de bioensayo.....	65
Tabla 11. Concentraciones letales (CL50 y CL90), de los diferentes aceites esenciales en una población de laboratorio de <i>Anastrepha ludens</i>	66
Tabla 12. Comparación entre la CL50 y CL90 del Eugenol y el AE de <i>E. caryophyllus</i>	66
Tabla 13. Índice de retención y composición relativa de los componentes químicos mayores de tres aceites esenciales.....	68
Tabla 14. Evaluación del efecto combinado de la CL50 del AE de <i>E. caryophyllus</i> y proteínas Cry parasporales provenientes de cuatro cepas de referencia.....	70
Tabla 15. Evaluación del efecto combinado de la CL50 del AE de <i>T. vulgaris</i> y proteínas Cry parasporales provenientes de cuatro cepas de referencia.....	71
Tabla 16. Evaluación del efecto combinado de la CL50 del AE de <i>O. basilicum</i> y proteínas Cry parasporales provenientes de cuatro cepas de referencia.....	72
Tabla 17. Evaluación del efecto combinado de la CL50 del AE de <i>E. citriodora</i> y proteínas Cry parasporales provenientes de cuatro cepas de referencia.....	73
Tabla 18. Evaluación del efecto combinado de la CL50 del AE de <i>L. angustifolia</i> y proteínas Cry parasporales provenientes de cuatro cepas de referencia.....	74
Tabla 19. Evaluación del efecto combinado de la CL50 del AE de <i>E. dives</i> y proteínas Cry parasporales provenientes de cuatro cepas de referencia.....	75
Tabla 20. Evaluación del efecto combinado de la CL50 del AE de <i>E. staigeriana</i> y proteínas Cry parasporales provenientes de cuatro cepas de referencia.....	76

LISTA DE TABLAS

Sección	Página
Tabla 21. Datos de la interacción de <i>Bacillus thuringiensis</i> cepas de referencia: HD1, HD500, HD567, y HD199 con los Aceites Esenciales (AE), de <i>Eugenia caryophyllata</i> (Ec), <i>Thymus vulgaris</i> (Tv), <i>Ocimum basilicum</i> (Ob), <i>Eucaliptus citriodora</i> (Eci), <i>Lavandula angustifolia</i> (La), <i>Eucaliptus dives</i> (Ed), y <i>Eucaliptus staigeriana</i> (Es), en adultos de <i>A. ludens</i> , tomado al séptimo día de bioensayo.....	77

LISTA DE FIGURAS

Sección	Página
Figura 1. Estructura tridimensional de la toxina activada Cry1Aa.....	38
Figura 2. Esquema del modo de acción de las proteínas Cry de <i>B. thuringiensis</i>	40
Figura 3. Diagrama de las relaciones ecológicas de <i>B. thuringiensis</i>	41
Figura 4. Clasificación morfológica de las cepas aisladas de suelo.....	57
Figura 5. Gel de agarosa al 1% presenta los productos de la PCR.....	58
Figura 6. Gel de poliacrilamida del 10% donde se muestra el perfil de espora-cristal de las 7 cepas seleccionadas por PCR.....	59
Figura 7. Porcentaje de mortalidad de adultos de <i>A. ludens</i> registrados después de siete días de tratamiento con los cristales parasporales de las cepas de Bt seleccionadas.....	62
Figura 8. Relación dosis mortalidad de diferentes aceites esenciales de plantas.....	64
Figura 9. Dinámica del efecto combinado de la CL50 del AE de <i>Eugenia caryophyllus</i> y proteínas Cry parasporales provenientes de cuatro cepas de referencia.....	70
Figura 10. Dinámica del efecto combinado de la CL50 del AE de <i>Thymus vulgaris</i> y proteínas Cry parasporales provenientes de cuatro cepas de referencia.....	71
Figura 11. Dinámica del efecto combinado de la CL50 del AE de <i>Ocimum basilicum</i> y proteínas Cry parasporales provenientes de cuatro cepas de referencia.....	72
Figura 12. Dinámica del efecto combinado de la CL50 del AE de <i>Eucaliptus citriodora</i> y proteínas Cry parasporales provenientes de cuatro cepas de referencia.....	73
Figura 13. Dinámica del efecto combinado de la CL50 del AE de <i>Lavandula angustifolia</i> y proteínas Cry parasporales provenientes de cuatro cepas de referencia.....	74
Figura 14. Dinámica del efecto combinado de la CL50 del AE de <i>Eucaliptus dives</i> y proteínas Cry parasporales provenientes de cuatro cepas de referencia.....	75
Figura 15. Dinámica del efecto combinado de la CL50 del AE de <i>Eucaliptus staigeriana</i> y proteínas Cry parasporales provenientes de cuatro cepas de referencia.....	76

NOMENCLATURA

α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AE (s)	Aceite (es) Esencial (es)
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CL50	Concentración Letal media
CL90	Concentración Letal al 90%
CTP	Caldo Trypticaseína fosfato
cv.	Abreviación de Latín <i>cultivarietas</i> (cultivar)
DL50	Dosis Letal media
DL90	Dosis Letal al 90%
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Dihidrato del Ácido Etilendiamino Tetraacético Dis
<i>et al.</i>	Abreviación de Latín <i>et alii</i> (y colaboradores)
g	Fuerza G
LB	Medio Luria Bertani
M	Concentración Molar
ml	Mililitros
mQ	Agua de grado molecular
NaCl	Cloruro de Sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanómetros
ng	Nanogramos
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
μ g	Microgramos
μ l	Micro litros
μ m	Micrómetros
μ M	Micro Molar
mM	Mili Molar

RESUMEN

Bacillus thuringiensis (Berliner) es una bacteria de suelo esporogénica la cual produce cristales de naturaleza proteica y pueden estar conformados por una o varias proteínas llamadas δ -endotoxinas o proteínas Cry, con actividad entomopatogénica. De la misma forma algunos aceites esenciales de plantas muestran un amplio espectro de actividad insecticida. En este trabajo se probó la actividad de siete cepas nativas de *B. thuringiensis* aisladas de suelo, incluidas cuatro cepas de referencia pertenecientes a la colección HD y diez aceites esenciales vegetales contra la mosca Mexicana de la fruta, *Anastrepha ludens* (Loew). De 202 cepas aisladas de muestras de suelo, de las cuales siete cepas fueron clasificadas por PCR como *B. thuringiensis*, la cepa IB-00107, caracterizada con el gen *cry10* presento la mayor mortalidad (30%) entre estas. Por otra parte, la actividad de las cepas de referencia de *B. thuringiensis*: HD1, HD199, HD500, y HD567; fue de 67, 75, 35, y 60% de mortalidad respectivamente. Con respecto a los aceites esenciales (AEs), siete de los diez utilizados mostraron toxicidad en adultos y la mortalidad fue proporcional a la concentración ingerida, los valores de toxicidad obtenida fueron los siguientes: *E. caryophyllus*, *T. vulgaris*, *O. basilicum*, *E. citriodora*, *L. angustifolia*, *E. dives*, y *E. staigeriana*, con una CL50 (% p/v) de: 0.35, 0.53, 0.81, 1.26, 1.68, 2.20, y 3.22 respectivamente. Además se reporta por primera vez en este estudio la toxicidad de estos AEs en *A. ludens*. Por otra parte, al observar la interacción entre ambos bioplaguicidas, en la mayoría de los casos, no existe diferencia significativa en la mortalidad cuando se administran de manera conjunta las proteínas Cry y los AEs, no obstante solo la combinación del AE de *O. basilicum* y las proteínas Cry de la cepa HD567, fue la única que presento una interacción de sinergismo adicional.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis (Berliner) is a sporogenic soil bacterium that produces proteinaceous crystals and may be formed by one or more proteins called δ -endotoxins or Cry proteins with entomopathogenic activity. Likewise some plant essential oils show a broad spectrum of activity against insect pests. In this work we tested the activity of seven native *B. thuringiensis* strains isolated from soil, including four reference strains belonging to the HD collection and ten plant essential oils, against the Mexican fruit fly, *Anastrepha ludens* (Loew). We classified by PCR seven strains out of 202 isolated from soil samples, belonging to *B. thuringiensis*, strain IB-00107 presented the highest mortality 30%, characterized with *cry10* gene. Moreover, the toxicity of the reference strains of *B. thuringiensis*: HD1, HD199, HD500 and HD567; was 67, 75, 35, and 60% respectively. With respect to essential oils (EOs), seven out of ten used, showed adult toxicity and mortality was proportional to the concentration, we reported for the first time the toxicity of these essential oils in *A. ludens*. In order of decreasing toxicity: *E. caryophyllus*, *T. vulgaris*, *O. basilicum*, *E. citriodora*, *L. angustifolia*, *E. dives*, and *E. staigeriana*, with an LC50 (% w/v): 0.35, 0.53, 0.81, 1.26, 1.68, 2.20, and 3.22 respectively. Only the combination: *O. basilicum* and HD567 presented additional synergism interaction for other EOs tested in this study, no significant difference in mortality when administered together Cry proteins and EOs.

1. INTRODUCCIÓN

La fruticultura en México es una de las actividades agrícolas mas redituables, comparada con la producción de cultivos básicos, por una parte debido al incremento en la exportación de los productos frutícolas a lo largo del tiempo, y por otra a la ventaja comparativa que brinda el clima del país para la producción de frutales en relación a otros países, dando como resultado la generación de divisas y empleos permanentes.

México tiene una superficie de 1.9 millones de hectáreas establecidas con árboles frutales, que producen anualmente 13 millones de toneladas de productos frutícolas (Aluja, 1993). Por lo que se refiere a las moscas de la fruta, en México al igual que en otros países en los que inciden, las moscas de la fruta constituyen un problema de relevancia significativa, ya que pueden ocasionar hasta un 37% de pérdida de fruta, incrementan los costos de producción y comercialización, afectan la calidad del producto e incrementan la contaminación ambiental, como efecto colateral, debido a el manejo basado principalmente en productos químicos como el malatión. Además, son la causa de la imposición de restricciones cuarentenarias que limitan el acceso de la producción a los mercados internacionales (Aluja, 1994).

La mosca Mexicana de la fruta, *Anastrepha ludens* (Loew), ocurre en la mayoría de las áreas citrícolas de México y daña, entre otros a dos de los frutales más importantes como son la naranja y el mango (Baker *et al.*, 1944; Cabrera y Ortega, 1992). En Nuevo León, la problemática por la mosca de la fruta puede agravarse, ya que de esta región es originario uno de sus hospederos silvestres, el chapote amarillo (*Casimiroa greggii*). El daño a las cosechas por la mosca de la fruta, se debe al crecimiento larvario dentro de los frutos y consecuente pérdida de la fruta, para evitar el daño se tienen que aplicar una serie de medidas que en consecuencia conducen al incremento de producción de los cultivos. Por lo tanto se necesitan nuevas alternativas de manejo que sean amigables con el ambiente y que puedan ser usados dentro de los programas de manejo integrado (Rocha-Peña y Padrón-Chávez, 2009).

Por otra parte entre las familias de plantas estudiadas (Asteraceae, Lamiaceae, Meliaceae, Piperaceae, Rutaceae), los compuestos de extractos crudos han mostrado toxicidad (Pavela, 2006), actividad anti alimentaria (Wheeler e Isman, 2001; Sadek, 2003; Pavela, 2004a), presencia de reguladores de crecimiento de insectos (Akhtar e Isman, 2004; Pavela, 2004b; Pavela, 2005), disuasión de la oviposición (Dimock y Renwick, 1991; Zhao *et al.*, 1998), supresión de la conducta de llamado (Khan y Saxena, 1986) y reducción en la fecundidad y la fertilidad (Pavela *et al.*, 2005), también se han obtenido resultados prometedores de algunas plantas con efectos toxicológicos en algunos miembros de la familia Tephritidae (Canale *et al.*, 2013; Benelli *et al.*, 2012). Una variedad de efectos tan amplia como esta, proporciona alternativas potenciales para el uso de insecticidas convencionales.

Además entre los agentes de control biológico de moscas de la fruta se ha evaluado a la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Berliner) en la mosca Mexicana de la fruta *Anastrepha ludens* (Loew), también en *Anastrepha obliqua* (Macquart), *Anastrepha serpentina* (Wiedemann) y en la mosca del mediterráneo *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Robacker *et al.*, 1996; Toledo *et al.*, 1999; Aboussaid *et al.*, 2010).

2. HIPÓTESIS

La combinación de las proteínas Cry de *B. thuringiensis* con un aceite esencial botánico presentan una toxicidad igual o superior que cualquiera de los dos anteriores de forma individual, contra el insecto plaga *Anastrepha ludens*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- Evaluación de la toxicidad de varias cepas de *B. thuringiensis* y aceites esenciales botánicos frente a los adultos de la mosca Mexicana de la fruta (*Anastrepha ludens*).

3.2 Objetivos particulares

- Aislamiento de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*, a partir de muestras de suelo.
- Identificación y caracterización de los aislados de *Bacillus thuringiensis* en base a los genes que codifican las proteínas Cry.
- Evaluación de la actividad bioinsecticida de las cepas aisladas y las siguientes cepas de referencia: HD-1, HD-199, HD-500 y HD-567.
- Evaluación de la actividad bioinsecticida de los siguientes aceites esenciales: varias especies de Eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labillardière, *Eucalyptus citriodora* Hook, *Eucalyptus dives* Schauer, *Eucalyptus staigeriana* F. Muell; [Myrtaceae]), Nim (*Azadirachta indica* A. Juss, [Meliaceae]), Lavanda (*Lavandula angustifolia*, P. Miller, [Lamiaceae]), Clavo (*Eugenia caryophyllus* Spreng, [Myrtaceae]), Albahaca (*Ocimum basilicum* L. [Lamiaceae]), Tomillo (*Thymus vulgaris* L. [Lamiaceae]) y Salvia romana (*Salvia sclarea* L. [Lamiaceae]) frente a los adultos de la mosca Mexicana de la fruta.
- Comparación de la actividad bioinsecticida del conjunto cristales parasporales y los aceites esenciales botánicos en la mosca Mexicana de la fruta.

4. ANTECEDENTES

4.1 La producción frutícola en México

La fruticultura en México es de gran importancia económica, ya que existe en este país una superficie de 1 900 000 ha dedicadas a 32 especies de cultivos frutales, lo cual equivale al 9.5% de la superficie cultivada, y una producción aproximada de 13 millones de toneladas anuales que representa el 16% del valor total de la producción agrícola (Aluja, 1993).

Los frutales que se destacan por su importancia en base a la distribución sembrada se encuentran los cítricos, mango, manzana, papaya y durazno (Aluja y Liedo, 1986). Así por ejemplo, la superficie cosechada en el 2007 para el cultivo de naranja fue en 335,812 ha; el limón agrio 87,056 ha; plátano 68,733 ha y el mango en 169,584 ha (INEGI, 2012).

4.2 Aspectos generales de la mosca de la fruta

Se considera a esta plaga el problema más grave para la producción frutícola a nivel mundial, debido a la gran variedad de especies existentes de moscas y a la relevancia económica de las plantas hospederas, en los cuales produce daños directos (crecimiento larvario en frutos) e indirectos (medidas cuarentenarias) lo cual conlleva pérdidas millonarias (Aluja, 1993; Gingrich, 1993).

4.2.1 Géneros de relevancia de la moscas de la fruta

A nivel mundial los de mayor impacto económico son: el de *Ceratitis* (Wiedemann), caracterizado principalmente por *Ceratitis capitata* (Wiedemann), nombre común “Mosca del Mediterráneo”, la cual afecta más de 250 especies de plantas (Christenson y Foote, 1960; Liquido, 1992). El género *Bactrocera* (o *Dacus*, Hendel), distribuido en el continente Africano, Europa, Asia y Australia. El género *Toxotrypana* (Gerstäcker), distribuido en Florida EUA, México y América central (Landolt y Hendrichs, 1983; Landolt *et al.*, 1991). El género *Rhagoletis* (Loew) localizado en zonas templadas y tropicales (Boller y Prokopy, 1976) y el género *Anastrepha* Schiner, en el cual se han reportado 185 especies presentes en el continente americano (Hernández- Ortiz y Aluja, 1993).

4.2.2 El género *Anastrepha* en México

En México constituye el de mayor relevancia; pertenece a la subfamilia Trypetinae (Norrbom y Foote, 1989), es endémico del continente Americano. Esta ampliamente distribuido en regiones tropicales y subtropicales del sur de EUA hasta el norte de Argentina. Hasta ahora se han identificado 180 especies, algunas especies son consideradas plagas serias de frutas nativas y exóticas, como son: *Anastrepha ludens* (Loew), *Anastrepha suspensa* (Loew), *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann), *Anastrepha obliqua* (Macquart), *Anastrepha striata* (Schiner) y *Anastrepha grandis* (Macquart). En México se han reportado 18 especies del género *Anastrepha* (Christenson y Foote, 1960), encontrándose hasta 160 especies pertenecientes a la familia Tephritidae (Aluja, 1993).

4.2.3 Biología de las moscas de la fruta

Son dípteros los cuales presentan una metamorfosis completa. Las condiciones ecológicas del ambiente juegan un papel fundamental en la duración de las distintas fases del desarrollo. Los factores que afectan el ciclo de vida de los tefrítidos son: alimento, temperatura, humedad, iluminación, flora nativa, sustrato de pupación, sustrato de oviposición y depredadores naturales (Hernández-Ortiz y Aluja, 1993).

El nivel poblacional de las moscas de la fruta es afectado en gran medida por la humedad, siendo afectado en época seca. Otro factor ambiental es la temperatura, la cual favorece las poblaciones altas en verano y bajas en invierno (Bateman, 1972; Aluja, 1993).

De acuerdo con las características ecológicas y fisiológicas, las moscas de la fruta se dividen en: a) especies univoltinas, si tienen una sola generación por año, presentan generalmente diapausa invernal b) especies multivoltinas si presentan varias generaciones a lo largo del año (Bateman, 1972).

4.2.4 Ciclo biológico

El ciclo de vida básico es muy similar entre las especies de *Anastrepha*, para las cuales se conoce su biología. En la mayoría de las especies, la hembra deposita sus huevos en el epi- o mesocarpio de la fruta madura del hospedero. Algunas especies tienen un ovipositor extremadamente delgado y largo (e.g. *A. sagittata*), el cual les permite ovipositar dentro de las semillas en lugar de la pulpa (Christeson y Foote, 1960), dependiendo de la especie la hembra deposita una serie de huevecillos (1-10). Estos huevecillos se incuban antes de eclosionar, aproximadamente tres días, el de la larva de nueve a 11 días y el de la pupa de 14 a 16 días. Bajo diversas condiciones en campo y laboratorio, la eclosión del huevo se ha prolongado hasta 12 días, el periodo larval hasta 35 días, la pupa a más de 100 días, el periodo de preoviposición hasta 30 días, la longevidad de las hembras 11 meses y la de los machos hasta 16 meses (Aluja, 1993).

4.2.5 Descripción de *Anastrepha ludens*

El adulto de la mosca Mexicana de la fruta tiene un tamaño de 7-11 mm, o ligeramente más grande que la mosca domestica (6-7 mm), con una coloración entre amarillo y café. Presenta rasgos de apariencia típicos que comparte con otras especies del mismo género, un rasgo notable de las hembras es su extenso ovipositor en relación al tamaño de su cuerpo, este mide entre 3.35-4.7 mm de longitud. La mosca mexicana de la fruta se distingue fácilmente de la mosca del Caribe (*Anastrepha suspensa*), por su ovipositor más largo, color de las bandas en las alas amarillo pálido, bandas costal y banda en S tocándose en la vena R4+5 o poco separadas. Banda en V separada de la banda en S o conectadas de manera ligera. Presenta en el tórax una franja delgada y clara que se ensancha hacia la parte posterior, y dos franjas más a los lados que llegan hasta la sutura transversal; frecuentemente con una mancha difusa en la parte media de la sutura escuto-escutelar; pleura y metanoto café amarillento y los dos con una franja café oscuro o negra (Aluja, 1993).

4.2.6 Distribución de *Anastrepha ludens*

A. ludens se encuentra ampliamente distribuida en la República Mexicana, reportándose en los Estados de: Aguascalientes, Baja California Sur, Chiapas, Coahuila, Colima, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz, Yucatán y Zacatecas (Hernández-Ortiz, 1992).

4.2.7 Plantas hospederas

Las moscas de la fruta pueden clasificarse en base el número de plantas hospederas, de tal manera dentro del género *Anastrepha* están las moscas que se afectan varias familias de plantas: Polífagas, las que atacan varios géneros de la misma familia: Oligófagas, las

que se alimentan de un solo género: Estenófagas, y por último las que solo tienen un hospedero: Monófagas (Hernández-Ortiz y Aluja, 1993).

Las polífagas y estenófagas son las especies más relevantes económicamente; ya que su espectro de plantas hospederas de importancia económica es muy amplio (Aluja, 1993).

Comúnmente las larvas se alimentan de la pulpa de la fruta, sin embargo han sido reportadas algunas especies que también se alimentan de las semillas o solo de estas, ejemplo de estas son *A. sagittata* (Stone) en zapote blanco, *Casimiroa edulis* Llave y Lex., *A. cordata* Aldrich en lecherilla *Tabernaemontana alba* Mill., y *A. creba* Stone en canela, *Quararibea funebris* (Llave) Vischer (Hernández-Ortiz, 1992). Se ha especulado que otras especies con ovipositos muy largos y delgados como las del género *Dentata* y *Daciformisa* presenten hábitos similares. (Norrbon y Kim, 1988).

4.3 Manejo integrado de moscas de la fruta

4.3.1 Generalidades

Este se basa en controlar las poblaciones de la plaga mediante el uso de todas las técnicas y herramientas disponibles, como objetivo final de evitar la pérdida económica por efecto de la plaga y reducir los efectos secundarios producto de su control (Aluja, 1993).

El manejo integrado involucra un amplio entendimiento de las variantes del problema, las cuales incluyen el conocimiento de la vegetación local y biológica, hábitos del insecto, el conocimiento de la fenología de los hospederos cultivados y silvestres, aspectos sociales, políticos y económicos, así como la determinación del momento oportuno de control en función de los niveles de población de la plaga; entre otros (Aluja, 1993).

4.3.2 Mecanismos de detección

Los principales mecanismos de detección son el muestreo de frutos y el trampeo de la plaga, permitiendo conocer la presencia, distribución y dinámica de la población de la plaga; a su vez permiten evaluar las medidas de control adecuadas (Aluja, 1993).

4.3.3 Muestreo

Este se realiza a través de la evaluación de los frutos, lo cual permite: detectar, ubicar geográficamente y monitorear las poblaciones en estado inmaduro de moscas de la fruta (Aluja, 1993).

4.3.4 Trampeo y uso de atrayentes

El trampeo constituye una de las actividades fundamentales de prevención en el manejo integrado de la mosca de la fruta, permite el monitoreo y en algunos casos el control (Aluja, 1993), para esto se han usado diferentes diseños y colores de trampas como son: Jackson, Steiner, Nadel, Harris, Boller, Tablero y McPhail (Steyskal, 1977; Villeda *et al.*, 1988; Sivinski, 1990; Robacker, 1990; Aluja, 1993; Malo, 1994). De las cuales la trampa McPhail ha probado ser la más eficiente para el monitoreo y/o control de la plaga (Aluja, 1993).

Dentro de los atrayentes utilizados en las trampas McPhail, se han usado: proteína hidrolizada de maíz, semilla de algodón y levadura de cerveza (Beroza *et al.*, 1960; Aluja, 1993; Epsky *et al.*, 1993) aunque también pueden utilizarse mezclas de melaza, jugo de piña y proteína hidrolizada (Aluja, 1994).

4.3.5 Control legal

Un aspecto importante dentro del manejo integrado es el control legal, las acciones legales repercuten en dispersión, control y erradicación de las plagas, Dentro de las medidas legales están las cuarentenas, permisos para movilizaciones de fruta, certificados de origen, constancias técnicas de la ejecución de las medidas de control entre otras; disposiciones todas ellas, emitidas de la Ley de Sanidad Fitopecuaria de los Estados Unidos Mexicanos decretada el 13 de Diciembre de 1974 y el reglamento de Ley de Sanidad Fitopecuaria de los Estados Unidos Mexicanos en materia de Sanidad Vegetal, emitido el 18 de Enero de 1980 (Aluja, 1993).

4.3.6 Control mecánico-cultural

Otro aspecto relevante dentro del control de plagas son las prácticas culturales (Djerassi *et al.*, 1974). Según Aluja (1993) este tipo de medidas puede llegar a controlar de un 60-80 % las poblaciones de plagas. Las medidas culturales incluyen: la recolección y destrucción de la fruta caída (Aluja, 1993, Toledo, 1993), reducción y control de maleza, para evitar que las moscas recién emergidas encuentren resguardo de los depredadores e inclemencias ambientales, rastreo de pupas en el suelo, así como las podas de la cosecha para evitar que el follaje excesivo sirva de refugio para las moscas (Aluja, 1993).

4.3.7 Manipulación del hábitat

La modulación del hábitat como medida de control de las moscas de la fruta se propuso por Aluja y Liedo (1986). Un ejemplo de esto es el uso de cultivos trampa, como el árbol de la ciruela mexicana *Spondias purpurea* lo cual reduce la infestación de *Anastrepha obliqua* en el cultivo de *Mangifera indica* (Aluja y Birke, 1993).

En otros estudios sobre el cultivo de la papaya se ha demostrado que la combinación con el trampeo periférico, tienen gran potencial para el control de *Toxotrypana curvicauda*, la mosca que afecta al cultivo de la papaya (Aluja *et al.*, 1997a; Aluja *et al.*, 1997b).

4.3.8 Técnica del insecto estéril

Descrita por Knippling en 1955, este método se basa en liberaciones masivas de moscas estériles, a las cuales sus pupas se trataron con radiación previamente (Burk y Calkins, 1983), este método también es útil cuando las poblaciones de mosca son pequeñas y aisladas. De tal manera, complementado con otras técnicas puede disminuir las poblaciones de la plaga (Djerassi *et al.*, 1974; McPheron, 1996).

Este método ha tenido resultados favorables en el control de la mosca del mediterráneo *C. capitata*, y también para disminuir poblaciones tempranas de adultos de *A. suspensa* (Holler y Harris, 1993) y también como estrategia de manejo de *A. oblicua* y *A. ludens* (Aluja *et al.*, 1996).

Se ha propuesto el modernizar esta técnica, mediante el uso y liberación solo de machos estériles, de tal forma minimizando los costos de producción de pupas y previniendo la perforación de los frutos a causa de la oviposición de las hembras estériles (Economopoulos, 1996).

4.3.9 Control químico

Se utiliza mediante el uso de atrayentes o cebos, los cuales se mezclan con insecticidas químicos, este método en combinación con otras estrategias de control reducen el daño causado por las moscas de la fruta (Aluja, 1993). Por el contrario, este tipo de medida ocasiona graves problemas ecológicos, como la mortalidad de insectos benéficos así como parasitoides (Messing, 1996), además de representar un peligro para las personas encargadas de aplicarlo (Gary y Mussen, 1984).

4.3.10 Métodos alternativos

Se han descrito varias alternativas para el control de la mosca de la fruta, los ejemplos incluyen el uso de reguladores de crecimiento de plantas, como el ácido giberélico aplicado a *Citrus sinensis* cv. Mars, reduce la susceptibilidad hacia el ataque de *A. ludens* (Greany *et al.*, 1991). Otros antecedentes que demuestran el uso de los reguladores de crecimiento, los cuales han mostrado reducir la fertilidad de los huevos de *C. capitata*, *D. dorsalis* y *D. cucurbitae* (Albrecht y Sherman, 1987) y de *A. ludens* (Martínez y Moreno, 1991).

Otras estrategias de control de las moscas de la fruta, es el uso de cubiertas las cuales se han aplicado en toronjas para matar hasta 95% las larvas en etapas tempranas de *A. ludens* (Hallman, 1997).

Además se han empleado sistemas para disminuir la temperatura de los frutos, mediante su inmersión en agua con temperaturas menores a los 5 °C, de esta forma se han obtenido resultados de mortalidad de hasta 90% en larvas de *A. suspensa* en frutos de carambola, *Averrhoa carambola* (L.) (Gould y Hennessey, 1997).

4.3.11 Control biológico

Es definido como el uso de enemigos naturales los cuales incluyen depredadores, patógenos, parásitos así como poblaciones antagónicas para mantener en niveles mínimos las poblaciones de insectos plaga (Djerassi *et al.*, 1974; Caltagirone, 1981; Strong *et al.*, 2000).

El control biológico brinda una alternativa sustentable para reducir el impacto ecológico causado por las medidas tradicionales (Howarth 1991; Shea y Possingham 2000, Lacey *et al.*, 2001). De esta forma el empleo de agentes de control biológico ha probado ser ecológicamente amigable (Batra, 1982) y seguro a los humanos (Pimentel, 1984).

4.3.12 Parasitoides

En lo que respecta a las moscas de la fruta; el uso de parasitoides para ha permitido el control de las poblaciones *Anastrepha* (Aluja *et al.*, 1990; Aluja, 1994). En este caso, la liberación de los parasitoides *D. tryoni* (Cameron), *D. longicaudata* (Ashmead), *Biosteres* (= *Opius*) *vandenboschi* (Fullaway, *Psytallia incisi* (Silvestre) en Florida, E. U. A. ha reducido las poblaciones de la mosca del Caribe *A. suspensa*, en un 43%. (Baranowski *et al.*, 1993).

Otros autores como Sivinski *et al.*, (1996) describen el uso de liberaciones de *D. longicaudata* para el control de *A. suspensa*, sus resultados demuestran disminuciones en las cantidades de moscas monitoreadas por trampeo en las zonas de liberación.

Burns *et al.*, (1996) reportaron la disminución en el número de moscas de *A. suspensa* que fueron capturadas, mediante el empleo de liberaciones aumentativas de *D. longicaudata*. Sin embargo el porcentaje de larvas en frutos colectados tuvo un registro de 8.8%.

En México se han descrito el uso de los siguientes parasitoides de moscas de la fruta: *D. longicaudata* (Ashmead); *Bracanastrepha anastrephae* (Vierech); *Doryctobracon crawfordi* (Vierech); *Doryctobracon aerolatus* (Széplegeti) *Ganaspis carvalhoi* (Dettimer); *Acerotoneuromyia indicum* (Silvestri); *Biosteres arisanus*; *Pachycrepoides windemia* y *Doryctobracon toxotrypae* (Muesebeck),: parasitando a *A. ludens*, *A. obliqua*, *A. serpentina*, *A. striata* y *T. curvicauda* (Aluja *et al.*, 1990; Piedra *et al.*, 1993; Aluja, 1994; Aluja *et al.*, 1998).

Algunas desventajas que presenta el uso de parasitoides esta la baja fecundidad en comparación a las moscas, dificultad para parasitar larvas dentro de los frutos debido a corteza larga y/o gruesa (Sivinski, 1996). Otras limitantes incluyen el uso del monocultivo en la agricultura, empleo de insecticidas químicos, dependencia de los

parasitoides a cierta densidad de hospedero, de tal manera que son efectivos cuando la plaga ya ha rebasado el umbral económico (Gingrich, 1993).

4.3.13 Bioplaguicidas

Los Bioplaguicidas son plaguicidas bioquímicos que ocurren naturalmente como sustancias que controlan las plagas mediante mecanismos no tóxicos. Los bioplaguicidas son organismos vivos (enemigos naturales) o sus productos (fotoquímicos, productos microbianos) o sub-productos (semioquímicos), los cuales son usados para el manejo de plagas dañinas para diferentes cultivos de interés comercial. Los bioplaguicidas tienen un rol importante en la protección de las cosechas, además en combinación con otras herramientas como el uso de químicos, implica un manejo integrado de plagas bio-intensivo empleado en los últimos años.

Los Bioplaguicidas o plaguicidas biológicos están basados en microorganismos patogénicos específicos en contra de las plagas blancas, que pueden ofrecer una solución ecológica y efectiva para los problemas de plagas. Estos suponen menos daños hacia el ambiente y los humanos. Los bioplaguicidas usados más comunes son organismos vivos, los cuales son patogénicos para la plaga de interés. Estos incluyen biofungicidas (*Trichoderma*), bioherbicidas (*Phytophthora*) y bioinsecticidas (*Bacillus thuringiensis*). El beneficio potencial para la agricultura y los programas de salud pública a través del uso de bioplaguicidas son considerables.

El interés en bioplaguicidas está basado en las ventajas asociadas con dichos productos, tales como:

- Producen inherentemente menos daños y menos carga para el medio ambiente.
- Diseñados para afectar solo una plaga específica o algunos organismos blancos.
- Con frecuencia son efectivos en pequeñas cantidades y fácilmente degradables, dando como resultado una menor exposición y evitando en gran manera los problemas de contaminación ambiental.

- Los bioplaguicidas pueden contribuir en gran manera cuando son usados como componente del Manejo Integrado de Plagas (IPM, por sus siglas en inglés).

Los bioplaguicidas se pueden clasificar como:

A. Plaguicidas Microbianos

Los plaguicidas microbianos contienen microorganismos (bacterias, hongos, virus, protozoarios o algas) como ingrediente activo. Los plaguicidas microbianos pueden controlar muchos tipos de plagas diferentes, aunque cada ingrediente activo por separado es relativamente específico para las plagas blanco. Por ejemplo, existen hongos que controlan algunas malas hierbas y otros hongos que matan insectos específicos. La mayor variedad conocida de plaguicidas microbianos pertenecen a la bacteria *Bacillus thuringiensis*, o Bt, el cual puede controlar ciertos insectos en la col, papa y otras cosechas. Bt produce una proteína la cual es dañina para ciertas especies de insectos. Otros plaguicidas microbianos actúan mediante competencia con los organismos plaga. Los plaguicidas microbianos necesitan ser continuamente monitoreados para asegurar que estos no son capaces de dañar a los organismos no-blanco, incluyendo los humanos.

B. Protectores incorporados a la planta (PIPs)

PIPs son sustancias plaguicidas que las plantas producen a partir de material genético añadido a esta. Por ejemplo, las plantas Bt, organismos genéticamente modificados para expresar proteínas Cry. Ambas, la proteína y su material genético, son regulados por la Agencia de Protección Ambiental (EPA); la planta en si no es regulada.

C. Plaguicidas Bioquímicos

Estas son sustancias que ocurren naturalmente como los extractos de plantas, ácidos grasos o feromonas las cuales controlan las plagas mediante mecanismos no tóxicos. Los plaguicidas convencionales, en contraste, son materiales sintéticos que usualmente matan a las plagas o las inactivan. Los plaguicidas bioquímicos incluyen

sustancias que interfieren con el crecimiento o la reproducción, funcionan como reguladores de las plantas o como sustancias que repelen o atraen a las plagas, entre ellas las feromonas. Debido a que algunas veces es difícil determinar si un plaguicida natural controla la plaga mediante un modo de acción no tóxico, la EPA ha establecido un comité para determinar si un plaguicida llena los criterios para ser un plaguicida bioquímico.

Los productos de plantas: El uso de productos botánicos está emergiendo como uno de los principales medios para ser usados en la protección de cosechas y del ambiente, por la contaminación de insecticidas.

Tabla 1.- Productos derivados de plantas que han sido registrados como Bioplaguicidas

Productos de plantas usados como Bioplaguicidas	Plagas Blanco
Limoneno y Linalol	Las pulgas, pulgones y ácaros, también hormigas de fuego, varios tipos de moscas, avispas y grillos.
Nim	Una variedad de insectos succionadores y mascaradores.
Piretrinas y Piretroides	Las hormigas, pulgones, cucarachas, pulgas, moscas y garrapatas
Rotenona	Insectos se alimentan de hojas, como pulgones, ciertos escarabajos (escarabajo de espárragos, Escarabajo de la hoja de frijol, escarabajo de patata de Colorado, escarabajo del pepino, escarabajo de la hoja de fresa, otros), orugas, así como las pulgas y los piojos.
Ryania	Las orugas (barrenador europeo del maíz, gusano elotero, y otros), trips.
Sabadilla	Insectos de la calabaza, insectos arlequín, trips, orugas, chicharritas y chinches

Tomado de Buss Park-Brown, 2002

4.4 Aceites esenciales de plantas usados como Bioinsecticidas

Hay más de 100.000 compuestos producidos durante el crecimiento y el desarrollo de ciertas especies, que se biosintetizan en la hojas, las flores, los frutos, la raíz, etcétera. Algunos de estos compuestos actúan como semioquímicos generadores de mensajes comportamentales específicos que afectan al insecto e influyen sobre la localización del hospedante, su alimentación, su oviposición, su crecimiento y su desarrollo (Mareggiani, 2001). Muchos semioquímicos desempeñan un papel esencial en los mecanismos defensivos contra los insectos fitófagos o herbívoros; esta propiedad los torna un campo interesante en la búsqueda de moléculas novedosas para el manejo de plagas agrícolas (Metcalf y Luckman, 1994).

Los aceites esenciales se definen como componentes aromáticos fuertes y que dan el distintivo olor, sabor o el olor de una planta. Estos son los subproductos del metabolismo de la planta y se denominan comúnmente como metabolitos volátiles secundarios de plantas. Los aceites esenciales se encuentran en vellosidades glandulares o cavidades secretoras de la pared celular vegetal y están presentes en forma de pequeñas gotas de líquido en las hojas, tallos, cortezas, flores, raíces y/o frutas de diferentes plantas. Las características aromáticas de los aceites esenciales proporcionan varias funciones para las plantas, incluyendo (i) atraer o repeler insectos, (ii) protegerse de calor o frío; y (iii) la utilización de componentes químicos en el aceite como materiales de defensa. Muchos de los aceites esenciales tienen otros usos como aditivos alimentarios, aromatizantes, y los componentes de los cosméticos, jabones, perfumes, plásticos y resinas.

Normalmente, estos aceites son líquidos a temperatura ambiente y pueden ser transformados fácilmente de un líquido a un estado gaseoso a temperatura ambiente o temperatura ligeramente más alta sin sufrir descomposición. La cantidad de aceite esencial que se encuentra en la mayoría de las plantas es de 1 a 2%, pero puede contener cantidades que varían de 0.01 a 10%.

Por ejemplo, el naranjo produce diferente composición de los aceites en sus flores, frutas, y hojas. En ciertas plantas, puede predominar un constituyente del aceite esencial, y en otros es un cóctel de diferentes terpenos. En *Ocimum basilicum* (albahaca), el estragol por ejemplo, representa el 75% de las del aceite, la β -asarona constituye 70-80% de los rizomas en *Acorus calamus*, el linalol en el rango de 50 a 60%, se produce en las semillas de cilantro y aceites hoja adquiridos desde diferentes lugares en diferentes intervalos de tiempo y es con mucho el constituyente más predominante seguido de p-cimeno, terpineno, alcanfor y limoneno.

La mayoría de los aceites esenciales forman parte de monoterpenos que son compuestos que contienen 10 átomos de carbono a menudo dispuestos en un anillo o en forma acíclica, así como sesquiterpenos que son hidrocarburos que comprenden 15 átomos de carbono. Terpenos más altos también pueden estar presentes como constituyentes menores.

Los grupos más predominantes son compuestos cíclicos saturados o insaturados o en un sistema aromático. Bicíclicos (1,8-cineol) y acíclicos (linalol, citronelal) estos ejemplos también hacen los componentes de los aceites esenciales. Sin embargo, la variabilidad intraespecífica en composición química existe, que es relativa a variaciones ecotípicas y razas o poblaciones quimiotípicas.

4.4.1 Aceites esenciales como plaguicidas verdes

Naturalmente el concepto verde sugiere evitar el uso de cualquier plaguicida a través de la educación pública y programas de concientización, desarrollado para informar al público sobre el riesgo potencial del uso de plaguicidas y las alternativas que están disponibles. De hecho, este tipo de programas de apoyo a la política de "evitación prudente". Varios pasos sugeridos en estos programas son la resiembra, alta siega, ciclo hierba, propagación abono, riego profundo de raíz, aireación del núcleo, alimentación de suelo de liberación lenta, el uso de organismos benéficos, etc. Este concepto es muy útil para los huertos, céspedes y estrategias de control de plagas.

El uso de aceites esenciales o sus componentes se suman a este concepto natural, debido a su volatilidad, la persistencia limitada en condiciones de campo y varios tienen exención bajo protocolos de regulación.

Los aceites esenciales se obtienen generalmente a través de la destilación al vapor de las plantas aromáticas, especialmente los utilizados como fragancias y aromas en la industria de los perfumes y de los alimentos, y más recientemente, para la aromaterapia y medicamentos como base de hierbas. Los aceites esenciales de las plantas se producen comercialmente de varias fuentes botánicas, muchos de los cuales son miembros de la familia de la menta (Lamiaceae).

Los aceites se componen generalmente de mezclas complejas de monoterpenos, fenoles biogénicamente relacionados, y sesquiterpenos. Los ejemplos incluyen 1,8-cineol, el constituyente principal de los aceites de romero y eucalipto; eugenol de aceite de clavo; timol de tomillo; mentol a partir de diversas especies de menta; asarones de cálamo; y carvacrol y linalool a partir de muchas especies de plantas. Un número de plantas de origen se han utilizado tradicionalmente para la protección de productos almacenados, especialmente en la región del Mediterráneo y en el sur de Asia, pero el interés en los aceites se renovó con la emergente demostración de sus actividades de fumigación y el contacto con insecticidas a una amplia gama de plagas en la década de 1990 (ISMAN, 2000). La acción rápida contra algunas plagas es indicativa de un modo de neurotóxico de acción, y hay evidencia de interferencia con el neuromodulador octopamina (Kostyukovsky *et al.*, 2002) de algunos aceites y con canales de cloro mediados por el receptor GABA por otros (Priestley *et al.*, 2003).

Los constituyentes terpenoides purificados de los aceites esenciales son moderadamente tóxicos para los mamíferos, con pocas excepciones, los productos a base de aceites son en su mayoría no tóxicos para los mamíferos, aves y peces (Stroh *et al.*, 1998), por lo tanto justifica su colocación bajo "plaguicidas verdes". Debido a su volatilidad, los aceites esenciales tienen persistencia limitada en condiciones de campo; aunque los enemigos naturales son susceptibles a través de contacto directo, depredadores y parasitoides que pueden volver a invadir un cultivo tratado días después del tratamiento

son poco probable a ser envenenado por el contacto de residuos como ocurre a menudo con insecticidas convencionales. Los efectos sobre los enemigos naturales aún no se han evaluado en condiciones de campo. Evidencia Reciente sobre un modo de acción octopaminergico para ciertos monoterpenoides (Bischof y Enán 2004; Kostyukovsky *et al.*, 2002), combinado con su simplicidad química relativa podría ser la clave para el descubrimiento de nuevos insecticidas.

Existen varios ejemplos de aceites esenciales como el de rosa (*Rosa damascene*), pachulí (*Pogostemon pachuli*), sándalo (*Santalum album*), *Lavandula* (*Lavandula officinalis*), geranio (*Pelargonium graveolens*), etc., que son bien conocidos en la perfumería y la industria de fragancias. Otros aceites esenciales tales como la hierba de limón (*Cymbopogon winteriana*), *Eucalyptus globulus*, romero (*Rosemarinus officinalis*), vetiver (*Vetiveria zizanoides*), clavo (*Eugenia caryophyllus*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) son conocidos por sus propiedades de control de plagas. Mientras que la menta (*Mentha piperita*) repele hormigas, moscas, piojos y polillas; el poleo (*Mentha pulegium*) ahuyenta pulgas, hormigas, piojos, mosquitos, garrapatas y polillas. La hierbabuena (*Mentha spicata*) y albahaca (*Ocimum basilicum*) son eficaces en la repelencia de las moscas. Del mismo modo, los aceites esenciales de plantas como *Artemesia vulgaris*, *Melaleuca Leucadendron*, *Pelargonium roseum*, *Lavandula angustifolia*, *Mentha piperita*, y *Juniperus virginiana* son efectivos contra diversos insectos y patógenos fúngicos (Kordali *et al.*, 2005).

Los estudios realizados sobre los efectos de los constituyentes volátiles del aceite de las especies de Menta son altamente eficaces contra *Callosobruchus maculatus* y *Tribolium castaneum*, las plagas de granos almacenado (Tripathi *et al.*, 2000). Los aceites esenciales derivados de eucalipto y hierba de limón también se han encontrado eficaces como repelentes de animales, anti alimentarios, acaricidas, insecticidas, y productos antimicrobianos; encontrando así usos desinfectantes, desinfectantes, bacteriostáticos, microbicidas, fungicidas y algunos han hecho impacto en la protección de las pertenencias del hogar.

El aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon citratus*, *Lavandula angustifolia* sin. *L. officinalis*, *Tanacetum vulgare*, *Melissoides robdosia*, *Acorus calamus*, *Eugenia caryophyllata*, *Ocimum spp.*, *Gaultheria procumbens*, *Cymium cuminum*, *Bunium Persicum*, *Trachyspermum ammi*, *Foeniculum vulgare*, *Abelmoschus moschatus*, *Cedrus spp.* son conocidos por sus variadas propiedades de control de plagas. El aceite esencial de Citronela (*Cymbopogon nardus*) se ha utilizado durante más de cincuenta años, tanto como repelente de insectos y repelente de animales. La combinación de unas gotas de cada uno de los aceites de citronela, limón (*Citrus limon*), Rose (*Rosa damascena*), *Lavandula* y albahaca con un litro de agua destilada es eficaz para alejar las plagas de insectos en interiores. La actividad larvicida del aceite de citronela se ha atribuido principalmente a su mayor constituyente el Citronelal, un monoterpeno (Zaridah *et al.*, 2003). El aceite esencial de *Vetiveria zizanioides* obtenido por destilación al vapor de raíces aromáticas contiene un gran número de sesquiterpenos oxigenados. Este aceite es conocido para proteger la ropa y otros materiales valiosos del ataque de insectos cuando se coloca en armarios, cajones y baúles. El aceite esencial de Catnip (*Nepeta cateria*) es altamente eficaz para repeler mosquitos, abejas y otros insectos voladores. El componente más activo de la hierba gatera ha sido identificado como nepetalactona. Repele mosquitos diez veces más que el DEET. Es particularmente eficaz contra el mosquito *Aedes aegypti*, vector del virus de la fiebre amarilla. El aceite de *Trachyspermum sp.* también es larvicida contra *A. aegypti* y *Culex quinquefasciatus* Say (CL50 = 93.19 a 150 ppm) (Vrushali *et al.*, 2001).

Similarmente, aceites esenciales de *Ocimum sanctum* causaron 20% de mortalidad en larvas de *S. litura* (Sharma *et al.*, 2001). Una dosis tópica de 100 mg/larvas, causaron más del 90% de mortalidad larval con el aceite esencial de *Satoreja hortensis*, *Thymus serpyllum* y *Origanum creticum* (DL50 = 48.4-53.4) los cuales se aplicaron a larvas de *S. litura* (Isman *et al.*, 2001). Estudios similares fueron reportados por Sharda *et al.* (2000) donde el aceite esencial de *Ageratum conyzoides* causó mortalidad de 68% a una dosis de 0.25 µl. Tripathi *et al.*, (2003) ha informado de la toxicidad del aceite esencial de *Aegle marmelos* por medio de aplicación tópica contra las larvas de *S. litura* con una

DL50 = 116.3 g/larvas. El aceite esencial de *Lippia alba* induce una inhibición del crecimiento.

4.4.2 Componentes de los aceites esenciales y su eficacia

Como se mencionó anteriormente los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos orgánicos naturales que están compuestos predominantemente de terpenos (hidrocarburos) como el mirceno, pineno, terpineno, limoneno, p-cimeno, α - y β -felandreno etc. y terpenoides (hidrocarburos que contienen oxígeno) como monoterpenos acíclicos (geraniol, linalol), alcoholes monocíclicos (mentol, 4-carvomentenol, terpineol, carveol, borneol), aldehídos alifáticos (citral, citronelal, perilaldehído), fenoles aromáticos (carvacrol, timol, safrol, eugenol), alcohol bicíclico (verbenol), cetonas (mentona, pulegona, carvona), cetonas bicíclicas monoterpénicas (tuyona, verbenona, fenchone), ácidos (ácido citronélico, ácido cinámico) y ésteres (acetato de linalilo).

Algunos aceites esenciales también pueden contener óxidos (1,8- cineol), que contienen constituyentes de azufre, antranilato de metilo, cumarinas, etc. zingibereno, curcumeno, farnesol, sesquifelandreno, termerona, nerolidol, etc., son ejemplos de sesquiterpenos (C15) aislados de los aceites esenciales. Constituyentes de aceites esenciales mono- y sesquiterpenoides se forman por la condensación de unidades de isopentenil pirofosfato. Diterpenos generalmente no ocurren en los aceites esenciales, muchos de ellos poseen potente actividad biológica y son responsables del sabor amargo y las propiedades tóxicas.

4.4.3 Los insecticidas e inhibidores del crecimiento

Los constituyentes de aceites esenciales son compuestos principalmente lipofílicos que actúan como toxinas, disuasivos de alimentación y anti-ovipositorios frente a una amplia variedad de insectos plaga. Han sido reportados propiedades insecticidas de varios monoterpenoides contra la mosca doméstica, el escarabajo rojo de la harina de maíz y gusano de la raíz (Rice y Coats, 1994). Aunque muchos monoterpenoides tienen propiedades insecticidas, el grado de toxicidad de los diferentes compuestos hacia determinada especie difiere considerablemente. Cornelius y colaboradores (1997) evaluaron la toxicidad de monoterpenoides contra *Coptotermes formosanus* (una termita subterránea) de los cuales el eugenol se encontró más eficaz como termiticida. También fue eficaz como fumigante y como elemento disuasorio de alimentación. El eugenol también se reporta como tóxico para el gusano asiático, *Spodoptera litura* Fabricius, gorgojo del granero, *Sitophilus granaries* L., *Musca domestica* L. y el gusano de la raíz del maíz, *Diabrotica virgifera* Lee Conte, (DL50 = 2.5 a 157.6 mg/insecto) (Hummelbrunner e Isman, 2001; Obeng-Ofori y Reichmuth, 1997; Lee *et al.*, 1997). El eugenol también es activo contra *Drosophila melanogaster* Meigen, *Aedes aegypti* y la cucaracha americana, *Periplaneta americana* L. (Bhatnagar *et al.*, 1993; Ngoh *et al.*, 1998). Del mismo modo, el timol induce toxicidad en *M. domestica* y *S. litura* (DL50 = 25.4 a 29.0 mg/insecto) (Lee *et al.*, 1997; Hummelbrunner e Isman, 2001) y también es tóxico para *D. melanogaster* y *Culex pipiens* (Franzios *et al.*, 1997; Traboulsi *et al.*, 2002). El Citronelal es tóxico para *S. litura* y *M. domestica* (DL50 = 66.0 a 111.2 µg/insecto; Hummelbrunner e Isman, 2001; Lee *et al.*, 1997), el gorgojo del frijol, *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) y *D. melanogaster* (Don-Pedro, 1996). El d-limoneno en el intervalo de 50 a 273.7 µg/insecto es tóxico para *M. domestica*, *D. virgifera*, *S. litura* (Lee *et al.*, 1997; Hummelbrunner e Isman, 2001) y algunas plagas y cucarachas de granos almacenados (Don-Pedro, 1996; Lee *et al.*, 2001). Del mismo modo, el limoneno encontrado en el aceite esencial de varias hojas de cítricos y cáscaras de frutas ha mostrado propiedades significativas de control de insectos (Karr y Coats, 1988). La mentona, trans-anetol y el cinamaldehído son compuestos insecticidas bien conocidos que han sido estudiados en contra de una variedad de insectos con amplia

gama de dosis requerida para matar el 50% de la población (65-1735 µg/insecto) (Marcus y Lichtenstein, 1979; Harwood *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1997; Franzios *et al.*, 1997; Huang y Ho, 1998; Hummelbrunner e Isman, 2001; Chang y Ahn, 2002; Lee *et al.*, 2001; Chang y Cheng, 2002). Meepagala *et al.*, (2006) encontró que el apiol de proveniente de *Ligusticum hultenii* exhibe alta actividad termiticida de 100% en un plazo de 11 días después del tratamiento y un efecto similar se muestra por vulgarona B, aislada de *Artemisia douglasiana*, mientras que la cnicina aislada de *Centaurea maculosa* mostró mortalidad del 81% dentro de los 15 días después del tratamiento cuando se aplica en 1.0% (p/p). El citral (3,7-dimetil 2,6-octadienal), el miembro más importante de monoterpenoides acíclicos es un líquido que tiene olor a limón y se produce en una medida del 60-80% en el aceite de limón. Este se produce como una mezcla de E (trans) y Z (cis) isómeros geométricos. Estos isómeros se denominan como geranial y neral, respectivamente, sin embargo muestran poco potencial en el control de plagas.

Lichtenstein *et al.* (1974) reportó que la carvona aislada de las partes aéreas de las plantas de eneldo (*Anethum graveolus* L.) fue insecticida para *Drosophila* y *Aedes spp.*, también suprimió la supervivencia larval y de adultos (Ouden *et al.*, 1993). Lee *et al.* (1997) evaluaron la toxicidad aguda de 34 monoterpenoides contra tres especies de insectos. Reportaron que el ácido citronélico y timol fueron los más tóxicos contra la mosca doméstica, mientras que citronelol y tuyona fueron más eficaces contra el gusano de la raíz del maíz. Hierro *et al.* (2004) ha informado de la acción de los diferentes compuestos monoterpénicos contra las larvas de *Anisakis simplex* y encontró que el geraniol, citronelol, citral, carvacrol y cuminaldehído fueron activos a una concentración de 12.5 µg/ml. El eugenol de *Eugenia caryophyllus*; 1,8-cineol del eucalipto; citronelal de la citronela *Cymbopogon nardus*; pulegona de *Mentha pulegium*, timol y carvacrol de *Thymus vulgaris* son algunos de los componentes más activos contra insectos. El eugenol muestra DL50 variables para cada especie. Pulegona se muestra para ser eficaz contra *M. domestica*, *D. virgifera*, *P. y saucia*, *S. litura* en el intervalo de DL50 = 38 a 753.9 µg/insecto (Lee *et al.*, 1997; Harwood *et al.*, 1990; Hummelbrunner e Isman, 2001). También se ha observado que la pulegona es más tóxica que el l-mentol contra el

barrenador del maíz europeo, *Ostrinia nubilalis* (Hubner). Fenoles sustituidos tales como eugenol, eugenol metílico, isoeugenol, safrol, isosafrol son mejores sustancias tóxicas y repelentes que monoterpenos, tales como limoneno, cineol y p-cimeno. El aceite esencial de la raíz de cálamus, *Acorus calamus* es también conocido por su acción insecticida y antigonadal asociado con su constituyente más abundante β -asarona (Koul *et al.*, 1990; Koul, 1995). Se ha demostrado que *A. calamus* induce mortalidad del 80.87% en larvas de *Spilarctia obliqua* (Walker) en laboratorio y 74.26% bajo condiciones de campo a 2.0% (Dubey *et al.*, 2004).

De acuerdo con Raina *et al.*, (2007) aceite de naranja extraído de la cáscara de cítricos (que contiene alrededor de 92% d-limonene) provocó mortalidad entre el 96 y 68% a la termita subterránea de Formosa, *Coptotermes formosanus* Shiraki dentro de 5 días y hubo una reducción significativa en la alimentación en comparación con los controles a una concentración de 5 ppm. El aceite de *Nepeta cataria* y sus dos componentes principales monoterpenos E y Z- nepetalactona, a 40 mg/cm² causó una mortalidad del 100% a la termita subterránea de Formosa, *C. formosanus* después de un día, mientras que a 20 mg/cm² causó un 97% de mortalidad (Chauhan y Raina, 2006).

Tabla 2. Aceites esenciales de plantas usados en el presente estudio que muestran actividad insecticida contra Dípteros

Planta	Insecto	Dosis	Mortalidad/ Dosis letal/ Tiempo letal	Actividad probada	Referencia
<i>Azadirachta indica</i>	<i>Lycoriella mali</i>	10,000 µg/ml	40 - 60%	Adulticida	Choi <i>et al.</i> , 2006
<i>Eucalyptus citriodora</i>	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	3.2 mg/mL	(63.21 ± 1.35)%	Larvicida	Maciel <i>et al.</i> , 2010
<i>Eucalyptus dives</i>	<i>Aedes aegypti</i>	50 ppm	96.7% - 24 hrs	Larvicida	Amer and Mehlhorn, 2006
<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	35 mg/mL	(78.47 ± 3.20)%	Larvicida	Maciel <i>et al.</i> , 2010
<i>Eucalyptus staigeriana</i>	<i>Lutzomyia longipalpis</i>	4 mg/mL	(73.44 ± 1.64)%	Larvicida	Maciel <i>et al.</i> , 2010
<i>Eugenia caryophyllus</i>	<i>Aedes aegypti</i>	CL50	62.3 ppm	Larvicida	Barbosa <i>et al.</i> , 2012
<i>Lavandula angustifolia</i>	<i>Bactrocera oleae</i>	LC50	6271 ppm	Adulticida	Canale <i>et al.</i> , 2013
	<i>Ceratitis capitata</i>	LC50	6860 ppm	Adulticida	Benelli <i>et al.</i> , 2012
	<i>Aedes aegypti</i>	50 ppm	63.3% - 24 hrs	Larvicida	Amer and Mehlhorn, 2006
<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Culex tritaeniorhynchus</i>	LC50; LC90	14.01; 23.44 ppm	Larvicida	Govindarajan <i>et al.</i> , 2013
	<i>Aedes albopictus</i>	LC50; LC90	11.97; 21.17 ppm	Larvicida	Govindarajan <i>et al.</i> , 2013
	<i>Aedes aegypti</i>	50 ppm	86.7% - 24 hrs	Larvicida	Amer and Mehlhorn, 2006
<i>Salvia sclarea</i>	<i>Aedes aegypti</i>	50 ppm	46.7% - 24 hrs	Larvicida	Amer and Mehlhorn, 2006
<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Anopheles gambiae</i>	LC50; LC80	119 ± 1.5 mg/L; 147 ± 2.4 mg/L	Larvicida	Tchoumboungnang <i>et al.</i> , 2009
	<i>Culex quinquefasciatus</i>	LC50; LC90	32.9 µg/mL; 99.1 µg/mL - 24 h	Larvicida	Pavela <i>et al.</i> , 2009
	<i>Ochlerotatus caspius</i>	LC50; LC90	15 µg/mL; 37 µg/mL - 24 h	Larvicida	Knio <i>et al.</i> , 2008

4.5 Bacterias patógenas de insectos

Los insectos representan el grupo más diverso, con más de un millón de especies reportadas (Romoser y Stoffolano 1998). Esto ha propiciado la aparición de diversas relaciones con microorganismos, en especial de naturaleza parasítica (Bode 2009). De esta manera los microorganismos patógenos han desarrollado diversas toxinas, en especial proteínas específicas contra insectos (de Maagd *et al.*, 2003).

Se ha reportado un número reducido de especies patógenas de insectos, pero estas han tenido bastante relevancia debido a su capacidad para el control de insectos plaga y al control de vectores de enfermedades (van Emden y Service 2004). Un gran número de bacterias son oportunistas, las cuales tienen la capacidad de matar al insecto fácilmente si logran alcanzar hemocele ya sea por una herida en el exoesqueleto. Sin embargo, otras bacterias han evolucionado para aprovechar los nutrientes que presenta el cuerpo del insecto, las cuales deben ser ingeridas por los hospederos vía intestinal. Algunas bacterias han desarrollado maneras para entrar en el hemocele directamente, mediante la creación de aberturas en la pared intestinal del insecto (Priest 2000, Hajek 2004). Los cuerpos de los insectos infectados con bacterias patógenas pueden cambiar de color, de blanco a rojo, ámbar, negro o marrón; además, estos cuerpos pueden ser un excelente medio de crecimiento para bacterias saprófitas.

Dentro de la familia Enterobacteriaceae existen algunas especies reportadas como patógenas de insectos (Priest 2000), tal es el caso de *Serratia entomophila* descubierta gracias a las investigaciones con la muerte del escarabajo de pastizal en Nueva Zelanda. Esta especie es la bacteria no esporulante que provoca mayor mortalidad, y mata bloqueando los intestinos de su hospedador (Jackson *et al.*, 1992). Otras especies de Enterobacteriaceae con actividad entomopatógenas incluyen a *Photorhabdus luminescens*, *Xenorhabdus nematophilus* (Forst y Neilson 1996, Forst *et al.*, 1997), y *Yersinia enterocolitica* (Bresolin *et al.*, 2006) entre otras.

Otras especies bacterianas no incluidas dentro de la familia Enterobacteriaceae también poseen actividad patógena para insectos, algunas de ellas son: *Pseudomonas entomophila* (Grimont *et al.*, 1988), *Erwinia carotovora* (Basset *et al.*, 2000), *Dickeya dadantii* (Grenier *et al.*, 2006).

Dentro del área de control biológico, es notable destacar que las bacterias más relevantes son las formadoras de esporas, en particular algunas especies del genero *Bacillus* (Priest 2000, Hajek 2004). El efecto insecticida varía dentro de las bacterias esporulantes, algunas llegando a ocasionar la mortalidad en días, y otras en meses. Una ventaja desde el punto de vista industrial, es la capacidad de producción masiva de las especies del genero *Bacillus*, y su facilidad para ser aplicados como bioinsecticidas (van Emden y Service 2004). Solo se han producido a gran escala cuatro especies bacterianas (Tabla 3); Así mismo, *B. thuringiensis* es la más utilizada como insecticida biológico.

Tabla 3. Especies de bacterias producidas en masa para el control de artrópodos (Hajek 2004)

Especie	Hospedadores diana	Modo de acción	Velocidad para matar	Producción en masa in vitro
<i>Bacillus popilliae</i>	larvas de escarabajos	enfermedad infecciosa	lento	-
<i>Bacillus sphaericus</i>	Larvas de mosquitos (<i>Culex</i> y <i>Anopheles</i>)	toxina binaria en cuerpo paraesporal	rápido	+
<i>Bacillus thuringiensis</i>	orugas, escarabajos, larvas de moscas	toxina en cuerpo paraesporal	rápido	+
<i>Serratia entomophila</i>	larvas de escarabajos	bloqueo del intestino	lento	+

4.5.1 El género *Bacillus*

Descrito por Ferdinand Cohn en 1872, este género se encuentra dentro de la familia Bacillaceae, orden Bacillales, División Firmicutes (Harwood 1989), e incluye 51 especies válidas (Priest *et al.*, 1988, Priest 1989, Pettersson *et al.*, 1999). Son bacterias Gram-positivas que poseen una morfología alargada simulando un bastón, son ubicuas en la naturaleza (se encuentran en suelo, agua, polvo, etc.), pueden ser aerobias estrictas o anaerobias facultativas; incluyen tanto especies de vida libre como especies patógenas, y varias especies son parte natural de la flora intestinal humana (Todar 2006). Una característica representativa es la capacidad de producir esporas bajo condiciones de estrés ambiental, lo cual puede implicar el agotamiento de los nutrientes en el medio de cultivo, por mucho tiempo fue la característica distintiva, pero no todas estaban estrechamente relacionadas, por lo cual fueron ubicadas en otros géneros (Pettersson *et al.*, 1999). Las únicas bacterias no incluidas en este género, capaces de producir esporas son las pertenecientes al género *Clostridium* (Todar 2006).

Las especies de mayor relevancia, tanto industrial, económica y patológica son *B. anthracis*, *B. cereus* y *B. thuringiensis*. Las primeras dos son de relevancia médica, *B. anthracis* causante de la enfermedad de carbunco o ántrax, en una gran variedad de mamíferos, y *B. cereus* relacionado principalmente con enfermedades causadas por alimentos en humanos e infecciones de órganos (Ledermann 2003). La última especie, *B. thuringiensis*, es un entomopatógeno de gran relevancia, el cual es usado como insecticida biológico para el control de plagas (Schnepf *et al.*, 1998).

Algunas especies del género *Bacillus* producen toxinas de naturaleza proteica las cuales han sido utilizadas como marcadores de clasificación, estas proteínas causan la lisis de eritrocitos de varias especies de mamíferos (hemolisinas), en cambio hay otras que son entomopatógenas (Turnbull y Kramer 1983, Hoult y Tuxford 1991, Schnepf *et al.* 1998). La ubicuidad de las especies de *Bacillus* en la naturaleza, la formación y resistencia de sus endoesporas, la producción de antibióticos, la toxicidad de sus esporas, y la producción de cristales proteicos tóxicos para varios ordenes de insectos hacen a este

género importante en medicina, agricultura, bioquímica y en la empresa farmacéutica (Todar 2006).

Las bacterias con capacidad patógena de insectos del género *Bacillus* representan la base de varios insecticidas biológicos comerciales. Las especies del género *Bacillus* patógenas de insectos más importantes, y por lo tanto mayoritariamente usadas en control biológico de plagas de insectos son: *B. sphaericus* (ahora *Lysinibacillus sphaericus*) (Ahmed et al. 2007), *B. laterosporus* (ahora incluida en el género *Brevibacillus*) (Shida et al., 1996), *Paenibacillus larvae*, *P. lentimorbis*, y *P. popilliae* (especies descritas formalmente como *Bacillus*) que son patógenos invasivos, y *B. thuringiensis* que forma un cuerpo paraesporal tóxico para insectos (Priest 1989, Smirnova et al. 1996, Todar 2006). Todas ellas muestran un amplio espectro y niveles de actividad correlacionada con la naturaleza de las toxinas, las cuales muy frecuentemente son producidas durante la esporulación (Charles y Nielsen-LeRoux 2000, de Maagd et al., 2003).

4.5.2 *Bacillus thuringiensis*, reseña histórica

Bt fue descubierto por primera vez en Japón por Shigetane Ishiwata (1901) como el agente causal de la enfermedad “soto” en larvas de los gusanos de seda (*Bombyx mori*) (Ishiwata 1901). En un informe posterior Ishiwata afirmó que "A partir de estos experimentos, la intoxicación parece ser causada por alguna toxina, no sólo debido a la alimentación de *Bacillus*, pero la muerte se produce antes de la multiplicación del bacilo..." Esto demostró que a partir del primer momento se dio cuenta de que una toxina estuvo implicada en la patogenicidad de Bt. Su identificación no fue completa, sin embargo, la primera descripción morfológicamente válida fue hecha por el bacteriólogo alemán Ernst Berliner (1915), que aisló el bacilo a partir de la polilla de la harina (*Anagasta kuehniella*) (Berliner 1915; Bajwa y Kogan 2001, Shelton et al., 2002). Le dio el nombre de *Bacillus thuringiensis* (Bt), que se deriva de Turingia, la ciudad alemana donde encontró la polilla. Tras los primeros ensayos de campo llevados a cabo en Hungría y la ex República de Yugoslavia en los años 20 y 30 respectivamente, *B. thuringiensis* hizo su debut en el mercado como insecticida biológico a finales de la

década de 1930. Fue comercializado por primera vez en Francia, bajo el nombre de Sporeine; sin embargo, su producción no fue masiva debido al inicio de la Segunda Guerra Mundial (Lord 2005).

Pocos años después de su descubrimiento, en la década de 1950, ya se encontraba disponible a nivel comercial, como formulaciones de esporas, y empezó a ser utilizada por productores de hortalizas para eliminar principalmente plagas causadas por larvas de lepidópteros (Schnepf *et al.*, 1998, Bajwa y Kogan 2001). Durante muchos años se pensó que *B. thuringiensis* era un patógeno exclusivo de lepidópteros; sin embargo, en 1978 se encontró una subespecie de *B. thuringiensis* (*israelensis*) activa frente a mosquitos, y en 1983 se describió una cepa de *B. thuringiensis* denominada *tenebrionis* activa frente a coleópteros (Schnepf *et al.* 1998). Fue a partir de entonces que un gran número de investigadores en todo el mundo se dedicó a realizar rastreos de cepas de esta especie bacteriana, encontrándose una gran cantidad de cepas con espectros de acción varios.

B. thuringiensis era simplemente uno más en el amplio arsenal de insecticidas naturales que eran usados corrientemente, antes de que el DDT abriera las puertas a la era de los insecticidas sintéticos. No existe evidencia de su uso a gran escala en los primeros 50 años de conocimiento de su existencia. Durante unos veinte años, *B. thuringiensis* sólo interesó a los agricultores que no querían usar insecticidas sintéticos; sin embargo, en el año 2007 se estimó que los productos de *B. thuringiensis* constituían alrededor de un 80% del mercado de bioinsecticidas, aunque estos productos sólo representaban alrededor del 2% del mercado global de insecticidas (Roh *et al.*, 2007).

4.5.3 Biología y ciclo de vida

B. thuringiensis es una bacteria aerobia estricta, Gram-positiva, flagelada, ubicua, esporulante, relacionada morfológica y genéticamente con *B. cereus* y *B. anthracis*, y usada como bio plaguicida en el control de insectos de interés agrícola y sanitario (Schnepf *et al.*, 1998, Crickmore 2005).

Taxonómicamente, se encuentra dentro de la clase Bacilli, orden Bacillales y familia Bacillaceae (Joung y Côté 2001). *B. thuringiensis* es una bacteria que presenta dos fases durante su ciclo de vida: la fase vegetativa y la fase esporulante (Schnepf et al. 1998). Es considerada una bacteria ubicua, debido a que sus esporas se han aislado de una gran variedad de lugares incluido el suelo y agua (Meadows et al., 1992, Schnepf et al., 1998), hojas de árboles (Meadows et al., 1992, Sánchez y Peña 1995), larvas de insectos muertos (Karamanlidou et al., 1991, Kaelin et al., 1994), y telarañas (Schnepf et al. 1998), aunque es más común encontrarla en productos almacenados, debido a que las condiciones aquí favorecen la permanencia de las esporas (Meadows et al., 1992, Schnepf et al., 1998).

Existe una gran variabilidad dentro de *B. thuringiensis*, el tamaño de su genoma puede variar de 2.4 a 5.7 Mb (Carlson et al. 1994). *B. thuringiensis* se clasifica de acuerdo a su serotipo H-flagelar, dicho de otra forma por las proteínas presentes en el flagelo, método desarrollado en la década de 1960 (Debarjac y Bonnefoi 1968). Se han identificado 69 serotipos diferentes y 13 grupos sub-antigénicos, en total 82 serovares, que han sido clasificados en subespecies (Lecadet et al., 1999).

Aunque éste es un método efectivo y simple, presenta limitaciones debido a que clasifica las cepas en base a un parámetro muy concreto, que es la composición proteica de sus flagelos, y por lo tanto no toma en cuenta otros factores que determinan la variabilidad de la especie. Esto puede resultar en que cepas de un mismo serovar presenten espectros insecticidas muy diferentes, por ejemplo existen cepas de *B. thuringiensis morrisoni* que presentan actividad sobre lepidópteros, coleópteros, dípteros, o ninguno de ellos (Roh et al., 2007). Además, existen ciertas cepas para las cuales no se puede determinar el serotipo-H, ya sea porque no poseen flagelos o porque son auto-aglutinantes (Jensen et al., 1995).

A diferencia de *B. cereus* y *B. anthracis*, *B. thuringiensis* produce un cristal proteico durante la fase de esporulación, de carácter insecticida (Helgason et al., 2000). Las proteínas que componen a estos cristales se llaman δ -endotoxinas, las más estudiadas y

caracterizadas son dos tipos: toxinas Cry y toxinas Cyt, en consecuencia se han caracterizado un gran número de cepas en base a la presencia de estas dos proteínas (Schnepf *et al.*, 1998).

Las δ -endotoxinas se distinguen por la formación de poros en membranas, específicamente frente a insectos de los órdenes: Lepidóptera, Coleóptera y Díptera, así como también: ácaros, nematodos, gusanos planos y protozoarios (Schnepf *et al.*, 1998, Lightwood *et al.*, 2000, Li *et al.*, 2001). Se unen a la superficie de la célula en su forma soluble y activa, al igual que otras proteínas y péptidos activos de membrana.

Una vez unidas a la membrana sufren varios cambios conformacionales, y consecuentemente son capaces de insertarse en la membrana. Ya embebidas en la membrana las δ -endotoxinas forman poros los cuales debido al flujo descontrolado de iones y solutos causan un desequilibrio osmótico, sin embargo estos poros excluyen macromoléculas, esto conduce a la muerte del insecto posterior a la lisis osmótica de las células intestinales, de manera general este es el modo de acción de las δ -endotoxinas (Schnepf *et al.*, 1998, Li *et al.*, 2001).

Como se mencionó anteriormente, *B. thuringiensis* tiene dos fases durante su ciclo de vida, la fase de vegetativa o de crecimiento y la fase esporulante o estacionaria (Schnepf *et al.* 1998). Durante la fase vegetativa, *B. thuringiensis* se duplica por bipartición a distinta velocidad dependiendo del medio de cultivo (Bravo *et al.*, 1992). La evidencia apunta a que la fase de crecimiento vegetativa sólo se presenta en el interior de los insectos que infecta, o cuando las condiciones ambientales son favorables. Cuando consume los nutrientes del insecto susceptible, esporula y es liberada al exterior donde permanece latente en forma de esporas, lo que explica su amplia distribución (Schnepf *et al.*, 1998, Li *et al.*, 2001).

La fase vegetativa de crecimiento concluye con el detrimento de nutrientes en el medio lo cual dispara el inicio de la fase estacionaria en la que se forma la endospora y las inclusiones cristalinas paraesporales características de la especie; en esta fase la célula es

denominada esporangio y está compuesta por dos compartimentos: la célula madre y la forespora (Agaisse y Lereclus 1995).

Los cristales proteicos insecticidas se expresan dentro de la célula madre durante la etapa de esporulación, la cual presenta siete estadios, e inicia cuando la bacteria se encuentra en limitación de nutrientes, y finaliza con la fase lítica, en la que la endospora se lisa, liberándose al medio la exospora y los cristales (Schnepf *et al.*, 1998). En el estadio I se inducen los genes que iniciarán la esporulación, esto ocurre en ausencia de nutrientes o en presencia de condiciones adversas para la bacteria; sin embargo, este punto puede ser reversible si se adicionan nutrientes (Schnepf *et al.*, 1998). A partir del estadio II de esporulación, el proceso es irreversible, con la formación de un septo de división asimétrico. En el estadio III, se inicia la síntesis del cristal insecticida, la cual continuará hasta el final de la esporulación, en un complejo proceso mediado por la expresión de los genes *cry* gracias a sus promotores Bt1 y Bt2, que actúan de manera secuencial en la síntesis del cristal insecticida. En el estadio VII se liberan a las esporas y los cristales insecticidas (Brown y Whiteley 1990, Bravo *et al.*, 1992, Schnepf *et al.*, 1998). La espora es una estructura biológica latente, la cual puede permanecer en estado de inactividad, y en privación de humedad y nutrientes por mucho tiempo. Cuando la espora se encuentra de nuevo en un medio con los nutrientes adecuados germina, para comenzar de nuevo su fase de crecimiento vegetativo (Brown y Whiteley 1990).

4.5.4 Familias de toxinas Cry y Cyt

Las δ -endotoxinas de *B. thuringiensis* se dividen en: proteínas Cry y proteínas Cyt. Estas toxinas de carácter insecticida forman los cristales paraesporales de *B. thuringiensis*.

Hasta la fecha se han clonado y secuenciado 538 diferentes genes *cry* y 33 diferentes genes *cyt* (Crickmore *et al.*, 2016). La clasificación inicial de las δ -endotoxinas estuvo basada en la actividad insecticida de los diferentes órdenes de insectos (Whiteley y Schnepf 1986). Es común encontrar en la naturaleza cepas de Bt con presencia de dos o más proteínas Cry, de tal manera que el conjunto de toxinas de determinada cepa define

su especificidad hacia ciertos insectos. Las toxinas fueron originalmente clasificadas en cuatro clases de acuerdo a su homología de la secuencia peptídica y las especificidades insecticidas (Höfte y Whiteley 1989). Las toxinas CryI son tóxicas en contra de lepidópteros; CryII son tóxicas contra lepidópteros y dípteros; CryIII son tóxicas contra coleópteros; CryIV son tóxicas contra dípteros. Dos clases adicionales, CryV y CryVI, fueron añadidos en la categoría de tóxicas contra nematodos (Feitelson *et al.*, 1992).

Las toxinas Cry, o δ -endotoxinas Cry en su forma activa tienen una masa molecular de 60-70 kDa, que comprenden tres dominios globulares. Un paso fundamental para ejercer su actividad tóxica dentro del intestino del insecto es la interacción de las toxinas Cry con receptores de la membrana apical del intestino medio, estos receptores del tipo de Aminopeptidasa N (APN) y Caderina ya han sido caracterizados en lepidópteros (Li *et al.*, 2001). Las δ -endotoxinas Cyt poseen una masa molecular de alrededor de 25 kDa en su forma activa, y tiene un único dominio. No se han caracterizado los receptores con los que interactúan estas proteínas, sin embargo se sabe que se insertan rápidamente en membranas conteniendo fosfolípidos con una cadena de ácido graso no saturada en posición syn-2 (Schnepf *et al.*, 1998, Li *et al.*, 2001).

El modo de acción de las toxinas Cry se basa en el uso de α -hélices para formar poros en la membrana, por otro lado las toxinas Cyt usan láminas β (Li *et al.*, 2001).

Actualmente las proteínas Cry se clasifican en base a su secuencia primaria y a la homología entre otras proteínas Cry, de tal manera que cada protoxina adquiere un nombre que consiste en el prefijo mnemotécnico Cry (o Cyt) y cuatro rangos jerárquicos que consisten en números y letras (ej. Cry25Aa1), dependiendo en su lugar en el árbol filogenético (Crickmore *et al.*, 2016). Así, las proteínas con menos de 45% de identidad en su secuencia difieren en los rangos primarios (Cry3, Cry4, etc.), y un 78% y 95% de identidad constituyen los bordes del rango secundario y terciario, respectivamente. Este sistema reemplaza la nomenclatura clásica de números romanos.

Se tomó como criterio principal la homología de la secuencia primaria para la clasificación de las proteínas Cry, sin embargo algunas proteínas como la Cry6 y Cry15 no presentan homología con otras proteínas Cry. Se ha documentado también la presencia de proteínas Cry en la bacteria anaeróbica *Clostridium bifermentans*, la cual produce las proteínas Cry16A y Cry17A, con actividad insecticida en mosquitos, este caso nos demuestra que no solo las proteínas Cry son producidas por bacterias del genero *Bacillus* (Barloy *et al.*, 1996).

Las protoxinas, o proteínas Cry inactivas necesitan de ciertos cortes proteolíticos para poder realizar su acción, en el caso de las protoxinas de 130-140 kDa, estas pierden aproximadamente la mitad posterior de la cola carboxi terminal. La función predicha de este largo segmento carboxilo terminal es servir para la formación de los arreglos cristalinos cuando se forman las proteínas Cry. En este fragmento se encuentra la mayor presencia de cisteínas, y juegan un papel importante para la solubilización de las protoxinas (Choma *et al.*, 1992). Los diferentes monómeros de protoxinas que comprenden estas inclusiones cristalinas están unidos por puentes disulfuros intracatenarios, formados a través de los residuos conservados de cisteína, localizados en la parte C-terminal de las protoxinas. Estas uniones disulfuro juegan un papel importante en la formación y la estabilización de la estructura cristalina (Revina *et al.*, 1999). Sin embargo, estos fragmentos C-terminales no son encontrados en algunas toxinas (Cry2, Cry3, Cry6, Cry10, y Cry11) o es muy pequeña en otras protoxinas (Cry1I y Cry13A), Cry1Ia y Cry1Ib tienen solo 75 aminoácidos, y Cry13A tiene 111 residuos (Bravo, 1997).

La estructura terciaria de las toxinas Cry está definida por tres dominios con características y funciones determinadas (Fig. 1). El dominio I consta de 7 α - hélices (6 hélices anfipáticas rodeando a una hélice central hidrofóbica). El dominio II formado por 3 láminas β antiparalelas empaquetadas alrededor de un centro hidrófobo, llamado prisma β . El dominio III está formado por dos láminas β antiparalelas (Schnepf *et al.*, 1998, Li *et al.*, 2001). El dominio I está involucrado en la inserción a la membrana y la

formación del poro, mientras que los dominios II y III intervienen en el reconocimiento y la unión a los receptores de membrana.

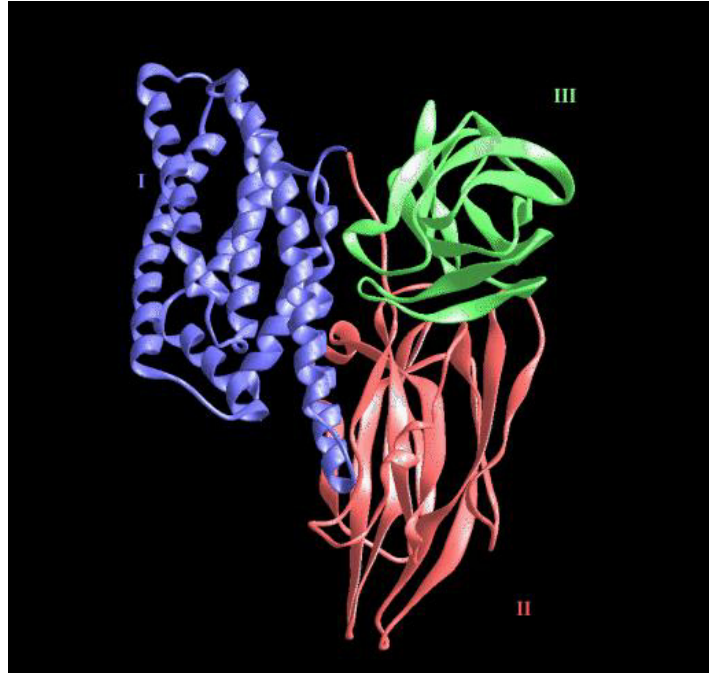


Figura 1. Estructura tridimensional de la toxina activada Cry1Aa. La toxina presenta tres dominios estructurales: dominio I (morado), implicado en la inserción en la membrana y en la formación del poro; dominio II (verde); y dominio III (naranja) implicado en el reconocimiento del receptor y en el anclaje. Tomado de Maagd *et al.*, (2001).

4.5.5 Modo de acción de las proteínas Cry

El mecanismo de acción de las toxinas Cry es un proceso complejo que se desarrolla en varias etapas (Fig. 2). De manera resumida, este mecanismo implica al menos, 7 pasos: 1) solubilización del cristal, 2) procesamiento de las protoxinas y activación, 3) unión al receptor, 4) inserción a la membrana, 5) oligomerización, 6) formación de poro y 7) lisis celular. En el campo, las formulaciones parasporales de Bt se depositan sobre las hojas de los cultivos a proteger, posteriormente las larvas, principalmente de lepidópteros se alimentan de las hojas, de tal manera que los cristales tóxicos son ingeridos, dentro del intestino medio estos cristales se solubilizan gracias al pH alcalino presente en el intestino del insecto, liberándose de esta forma la protoxina (Gringorten *et al.*, 1992).

En el caso de las protoxinas de 130-140 kDa, la digestión comienza en el extremo C-terminal y progresa en varios pasos hasta degradar la mitad C-terminal de la protoxina (unos 500 aa), dando lugar a un polipéptido de 60-70 kDa. Las toxinas cortas, como Cry2, Cry3 y Cry11, en cambio, no son procesadas en su extremo C-terminal, por ello han sido consideradas productos truncados naturales de las toxinas de mayor tamaño (Höfte y Whiteley, 1989). Las toxinas activas se unen por su extremo C-terminal a una caderina en el extremo apical de la membrana de las células epiteliales del intestino (Bravo *et al.*, 2004). A la vez, la unión de la toxina a la caderina facilita la escisión un pequeño péptido de no más de 60 aa del extremo N-terminal de la toxina, y se establece una forma pre-poro de la toxina con una afinidad incrementada por un receptor secundario que puede ser aminopeptidasa N o fosfatasa alcalina (Lu *et al.*, 1994). La unión a este segundo receptor, facilita la formación del poro en el epitelio del intestino medio, lo cual provoca un desequilibrio osmótico y la posterior lisis celular (Bravo *et al.*, 2004). La larva pierde la capacidad de digerir y asimilar nutrientes y muere.

En síntesis los síntomas producto de la ingestión de las toxinas son los siguientes: 1) cese de la ingesta, 2) parálisis del intestino, 3) excreción de residuos (vómito y diarrea), 4) parálisis total, y 6) la muerte. La larva intoxicada por *B. thuringiensis* presenta un color negro característico, debido a la necrosis de los tejidos (Bravo *et al.*, 1992; Bajwa y Kogan, 2001). El mecanismo de acción detallado anteriormente es el modelo que ha sido aceptado por la comunidad científica durante décadas; sin cambio, Broderick *et al.*, (2006) sugirieron un nuevo modo de acción, en el cual la toxicidad de *B. thuringiensis* depende de la presencia de la microbiota intestinal del insecto diana. La eliminación de esta comunidad microbiana mediante la administración oral de antibióticos eliminó la actividad insecticida de *B. thuringiensis*, a su vez el restablecimiento de la comunidad bacteriana natural restableció la capacidad de matar. En contraste, existen varios estudios con otros modelos de insectos que rechazan la hipótesis de este nuevo modelo de acción propuesto (Johnston y Crickmore, 2009; Raymond *et al.*, 2009).

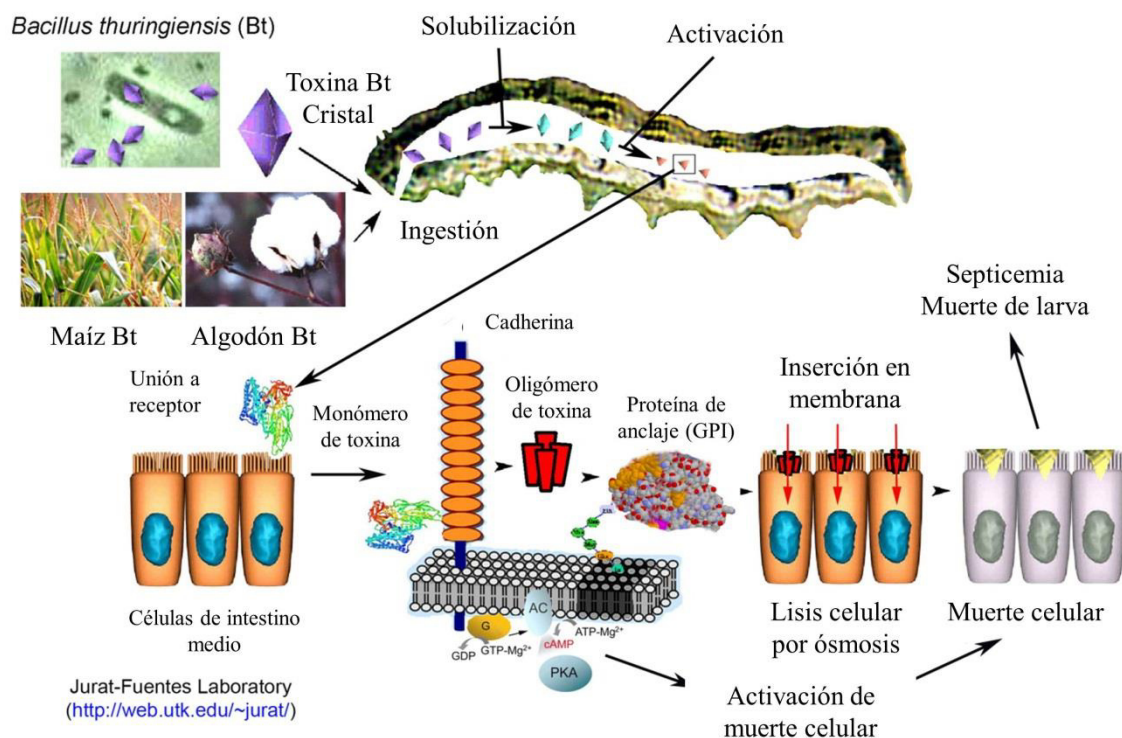


Figura 2. Esquema del modo de acción de las proteínas Cry de *B. thuringiensis*. Realizado por Juan Luis Jurat-Fuentes, Departamento de Entomología y Patología Vegetal, Universidad de Tennessee. (Tomado de: <http://web.utk.edu/~jurat/Btresearchtable.html>)

4.5.6 Ecología

Casi 100 años después de su descubrimiento, no se ha caracterizado por completo la ecología y las relaciones bióticas de *B. thuringiensis* (Jensen *et al.*, 2003, Raymond *et al.* 2008), inclusive algunos investigadores aún consideran la ecología de este como un misterio (Jensen *et al.*, 2003). Los datos acerca de la gran cantidad de insectos susceptibles no concuerdan totalmente con la gran variabilidad de cepas reportadas de *B. thuringiensis* (Martin y Travers 1989), este y otros datos han propiciado la especulación para deducir el rol ecológico de *B. thuringiensis* en la naturaleza. Han surgido varias suposiciones, una de estas sugiere que *B. thuringiensis* es microorganismo de suelo con actividad insecticida secundaria (Martin y Travers 1989), que *B. thuringiensis* es parte

de la comunidad bacteriana del filoplano y que ha evolucionado para proveer protección simbiote contra el ataque de insectos (Smith y Couche 1991, Elliot *et al.*, 2000), o que Bt es parte de la flora comensal microbiana de algunos insectos sin llegar a causar la muerte (Jensen *et al.*, 2003). Destacando en particular un reporte que analizó cuantitativamente esta hipótesis, la cual dice que Bt puede reproducirse como organismo comensal (Raymond *et al.*, 2007), las hipótesis anteriores no han sido demostradas de manera experimental. No obstante, Raymond *et al.* (2010) demostraron experimentalmente que el hábitat de Bt es el suelo, pero se comporta como patógeno específico de algunos insectos, esto debido al movimiento entre el suelo y las partes aéreas de las plantas, como factor fundamental de su ecología (Fig. 3).

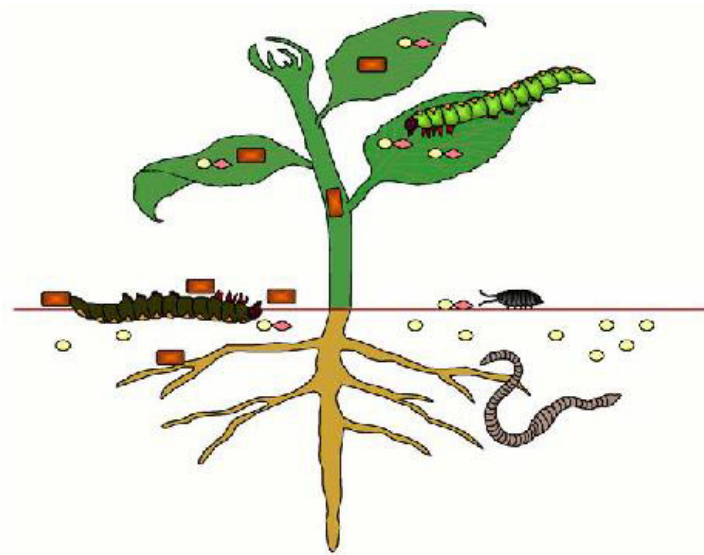


Figura 3. Diagrama de las relaciones ecológicas de *B. thuringiensis*. En el diagrama se muestran los lugares de donde *B. thuringiensis* ha sido aislado y donde puede replicarse. Los sitios posibles para su reproducción incluye el suelo, la rizosfera, el filoplano, o dentro de insectos (u otros invertebrados) vivos o muertos. Se muestran tanto la fase vegetativa (rectángulo rojo), como las esporas (óvalos amarillos). Tomado de Raymond *et al.*, (2010).

4.5.7 Aplicaciones en Control Biológico

Se han conseguido tres principales aplicaciones de las toxinas de Bt: (i) en el control de plagas defoliadoras en el sector forestal, (ii) en el control de los mosquitos que son vectores de enfermedades humanas, y (iii) en el desarrollo de plantas transgénicas resistentes a los insectos. Una de las aplicaciones más exitosas de Bt ha sido el control de lepidópteros defoliadores, que son las plagas de los bosques de coníferas, principalmente en Canadá y Estados Unidos. En ambos países, el control se basa principalmente en el uso de la cepa de Bt, HD-1, produciendo las toxinas: Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry2Aa (van Frankenhuyzen, 2000; Bauce *et al.*, 2004). La aplicación exitosa de Bt es dependiente de, las condiciones climáticas y la dosis alta de las aplicaciones en forma de aerosol pulverizado. Estos factores se combinan para determinar la probabilidad de ingestión de una dosis letal en larvas (van Frankenhuyzen, 2000; Bauce *et al.*, 2004). El uso de Bt en el control de defoliadores ha dado lugar a una reducción significativa en el uso de insecticidas químicos para el control de plagas en los bosques. *B. thuringiensis israelensis* (Bti) es altamente activo contra los mosquitos vectores de enfermedades como *Ae. aegypti* (vector del dengue), *Simulium damnosum* (vector de la oncocercosis) y ciertas especies de *Anopheles* (vectores de la malaria).

Su alta actividad insecticida, la falta de resistencia al Bti, la falta de toxicidad para los organismos no blanco y la aparición de poblaciones resistentes a los insecticidas químicos dio lugar a una rápida aplicación de Bti como un método alternativo de control de las poblaciones de mosquitos y los simúlidos (Becker, 2000). En 1983, se puso en marcha un programa de control para la erradicación de la oncocercosis en once países de África Occidental utilizando Bti ya que las poblaciones de *S. damnosum* habían desarrollado resistencia a los organofosforados larvicidas (Guillet *et al.*, 1990). Actualmente, más del 80% de esta región está protegida por las aplicaciones de Bti y 20% con el larvicida químico, temefos. Además, el control de la oncocercosis ha protegido a más de 15 millones de niños sin la aparición de resistencia hacia el Bti en la mosca negra (Guillet *et al.*, 1990).

El éxito de la lucha contra los vectores usando Bti sin duda aumentará su uso en todo el mundo. Sin embargo, la baja actividad de Bti a ciertos mosquitos vectores, principalmente anofelinos, requerirá el aislamiento de otras cepas de Bt con nuevos genes cry más eficaces contra estos vectores de enfermedades importantes. El desarrollo de cultivos transgénicos que producen proteínas Cry ha sido un desarrollo considerable. Por lo tanto el uso de cultivos resistentes a insectos ha disminuido considerablemente el uso de pesticidas químicos en las zonas donde se plantan estos cultivos transgénicos (Qaim y Zilberman, 2003). Curiosamente, el uso de algodón Bt en países como China, México y la India mostró que el uso de este tuvo un efecto significativo en el rendimiento final y una reducción en el uso de pesticidas químicos, ya que en estos países el rendimiento pérdida se debe principalmente a las limitaciones técnicas y económicas, que son superados en parte por el uso de cultivos resistentes a insectos (Qaim y Zilberman, 2003; Toenniessen *et al.*, 2003).

Dentro de las investigaciones con *B. thuringiensis* contra moscas de la fruta se tienen las realizadas por Robacker *et al.*, (1996) quienes consignan que al evaluar 55 aislados de Bt en la presentación en pellet y sobrenadante, contra larvas del tercer estadio de *A. ludens* encontraron, que dos aislados de Guatemala fueron los más virulentos, alcanzando el 100 % de mortalidad en larvas más pupas; le siguieron en efectividad las cepas HD 2 y la HD146 provenientes del laboratorio del Dr. Howard Dulmage.

Cuando investigaron varios cientos de aislados de Bt contra la mosca del olivo *Bactrocera oleae* Alberola *et al.*, (1999) encontraron que determinados aislados provenientes de diferentes áreas de Grecia, Cerdeña (Italia), España, y también de otros científicos alrededor del mundo; se encontró que estos fueron tóxicos en adultos o larvas y algunos para ambos estados de la mosca del olivo. Asimismo al evaluar los aislados más tóxicos en el parasitoide más importante de *B. oleae*; *Opius concolor* Szepi (Hym. Braconidae) se observó que solo tres aislados de Bt de 14 examinados presentaron mortalidad significativa en el parasitoide.

Tabla 4. Antecedentes que muestran actividad insecticida de *B. thuringiensis* contra tefrítidos (Diptera: Tephritidae)

Cepas Relevantes	Insecto	Dosis	Mortalidad/ Dosis letal/ Tiempo letal	Actividad probada	Referencia
HD565, HD199, HD567, HD1, GUAT1 y GUAT2	<i>A. ludens</i>	100 mg/ml	65-80%, 10-21 Días	Adulticida	Robacker <i>et al.</i> , 1996
Bt Subsp. <i>Darmstadiensis</i>	<i>A. ludens</i>	50-100 mg/ml	70-75%	Adulticida	Martínez <i>et al.</i> , 1997
Bti, 18 cepas no identificadas	<i>B. oleae</i>	Suspensión E-C (2.4 Abs λ 600 nm)	>65%	Adulticida	Bel <i>et al.</i> , 1997
HD567, BtA7	<i>C. capitata</i>	333.33 μ l/g de E-C	33% y 81%	Adulticida	Aboussaid <i>et al.</i> , 2010a
Bti (Skeetal), B. sphaericus	<i>C. capitata</i>	5-50 μ g de toxina / unidad experimental	30%	Adulticida	Vidal-Quist <i>et al.</i> , 2009
Bt serotipo H10	<i>C. capitata</i>	10% p/p E-C	77% - 8 días	Adulticida	Gingrich 1987

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Caracterización y evaluación de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* en adultos de *Anastrepha ludens*

5.1.1 Cepas bacterianas

B. thuringiensis fue aislado de muestras de suelo de huertos de cítricos ubicados en Montemorelos, NL, noreste de México; Se obtuvieron a una profundidad de 10 cm. El método se basa en la inhibición selectiva de la germinación de las esporas de *B. thuringiensis* por el acetato de sodio (CH_3COONa), mientras que otras cepas formadoras de esporas bacterianas germinaron en medio rico en la presencia de esta sal. Las cepas de referencia (*Bt tohokuensis*, HD-1, HD-199, HD-500 y HD-567) fueron proporcionadas por la colección del Instituto de Biotecnología de la UANL.

5.1.2 Aislamiento de cepas bacilos a partir de suelo

Las cepas fueron obtenidas a partir de muestras de suelo recogidas en el campo, el procedimiento de selección en acetato fue seguido con algunas modificaciones (Travers y Martin 1987): 0.25 g de muestra fue colocado en un matraz de 125 ml, que contenía 25 ml de caldo LB (triptona Bacto: 10 g, extracto de levadura: 5 g, NaCl: 10 g, fórmula por litro) además de 0.25 M de acetato de sodio. La suspensión estuvo 4 h bajo agitación a 250 rpm y 30 °C para permitir la germinación de todas las bacterias esporuladas, a excepción de *B. thuringiensis*. Un ml de la suspensión fue colocado en un tubo eppendorf de 1.5 ml y calentado a 80 °C en un baño de agua durante 10 min. Por lo tanto, todas las bacterias no esporuladas y células vegetativas resultantes de bacterias formadoras de esporas fueron eliminadas por tratamiento térmico. Posteriormente 100 µl de muestra tratada térmicamente fueron inoculadas en placas LB, se incubaron 24 h a 30 °C.

5.1.3 Clasificación basada en la producción de cristal

Las cepas que mostraron similitud morfológica al género *Bacillus* fueron seleccionadas. Cada cepa fue inoculada en una placa de medio de cultivo LB por el método de estría cruzada para obtener cultivos puros. Una vez obtenido el cultivo puro, cada cepa se inoculó en placas de medio CTP (caseína peptona: 17 g, peptona de soya 3 g, NaCl: 5 g, K₂HPO₄: 2.5 g, fórmula por litro) las cuales se incubaron a 30 °C durante 72 h, para inducir la esporulación. Se verificó la morfología microscópica de los bacilos y cristales del cultivo puro, para esto usamos un microscopio de luz modelo: BX43F (OLYMPUS, Miami, FL).

5.1.4 Extracción de ADN

Un total de 202 cepas aisladas previamente fueron sembradas en matraces de 125 ml con 50 ml de caldo nutritivo (extracto de carne: 3 g, peptona: 5 g, fórmula por litro) estas cepas se incubaron por 24 h a 30 °C y 250 rpm de agitación. La extracción de ADN fue bajo el método de Cheng y Jiang (2006): Se centrifugó 1 ml de suspensión celular a 8000 xg durante 2 min, después de retirar el sobrenadante; las células fueron lavadas dos veces con 400 µl de buffer STE (NaCl 100 mM, Tris/ HCl 10 mM, 1 mM EDTA, pH 8.0) y centrifugadas a 8000 xg durante 2 min. Los sedimentos fueron resuspendidos en 200 µl de tampón TE (Tris/HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0). Posteriormente se le añadió a estos tubos 100 µl de fenol saturado con Tris (pH 8.0), seguido por un paso de mezcla de vórtice de 60 s, para romper las células. A continuación las muestras fueron centrifugadas a 13000 xg durante 5 min a 4 °C para separar la fase acuosa de la fase orgánica, se transfirió 160 µl de la fase acuosa superior a un tubo de 1.5 ml limpio, y se añadió 40 µl de buffer TE para hacer 200 µl, esto fue mezclado con 100 µl de cloroformo y centrifugado durante 5 min a 13000 xg a 4 °C. El lisado fue purificado por extracción con cloroformo hasta que desapareció una interfaz de color blanco. Se transfirieron 160 µl de la fase acuosa superior a un tubo de 1.5 ml limpio. La fase acuosa la cual contenía el ADN purificado fue utilizada para los experimentos posteriores o almacenada a -20 °C. La pureza y el rendimiento del ADN fue determinada mediante el

cálculo de absorbancia a 260 nm y los valores A260/A280 para determinar las concentraciones de ADN e impurezas de proteínas respectivamente.

5.1.5 Diseño de cebadores para PCR Múltiple

Las secuencias de genes *cry* fueron obtenidas de la clasificación de Crickmore *et al.* (2016) en formato fasta para los siguientes genes *cry*: *cry2* (72 secuencias), *cry4* (15 secuencias), *cry10* (5 secuencias), *cry11* (8 secuencias) y *cry19* (3 secuencias) las cuales se encuentran en la base de datos NCBI. Por consiguiente fue usado el software de ensamblado de secuencias CAP3 (Huang y Madan 1999) para crear un cóntigo para cada uno de los 5 genes en cuestión. Además fue utilizado el software Mpprimer (Shen *et al.* 2010) para el diseño de cinco pares de cebadores (2M, 4M, 10M, 11M, 19M), los cuales se emplearon para la PCR múltiple, las secuencias y las temperaturas están registradas en la tabla 5. Los anteriores cebadores fueron empleados para una clasificación parcial de las cepas. Posteriormente se usaron cebadores reportados en la literatura (Carozzi *et al.* 1991, Ejiofor y Johnson 2002) para confirmar la presencia de los genes *cry* mediante PCR convencional, estos se muestran en la Tabla 5 (4, 10, 11 y 19).

Tabla 5. Secuencia de oligonucleótidos para la amplificación de los genes *cry*: 2, 4, 10, 11 y 19.

Par de Oligos ^a	Gen detectado	Tamaño del producto (pb)	Temperatura de alineamiento, (°C)	Oligo sentido (FP) / Oligo reverso (RP)	Referencia
4	<i>cry 4</i>	797	55	5'-CAAGCCGCAAATCTTGTGGA / 5'-ATGGCTTGTTTCGCTACATC	Carozzi <i>et al.</i> 1991
10	<i>cry 10</i>	404	55	5'-TCGTGGAATGGGCAAAAAC / 5'-TATCCCCCTTCAACATCCTCA	Ejiofor and Johnson 2002
11	<i>cry 11</i>	485	55	5'-TTTGCACCAGATAATACTAAGGAC/ 5'-AACAACTGCGATAAATACCACTCT	Ejiofor and Johnson 2002
19	<i>cry 19</i>	355	55	5'-AGGGGAGTCCAGGTTATGAGTTAC/ 5'-ATTTCCCTAGTTAGTTCGGTTTTT	Ejiofor and Johnson 2002
2M	<i>cry 2</i>	369	59.2	5'-ACCCAGTTCCAGATGCAAGGA / 5'-TGCTGTGGTCCACTACCACTTGC	Presente estudio
4M	<i>cry 4</i>	106	59.2	5'-TGGATGCACGAGTGGCACAAGC / 5'-GCATTTCCAGTTACATGCCACCCCA	Presente estudio
10M	<i>cry 10</i>	468	59.2	5'-CGCAACATAATCTGGGGAGCGGT / 5'-TCCACCTGTGTGACCAGGACCTT	Presente estudio
11M	<i>cry 11</i>	588	59.2	5'-TTTAACTGCGCCAGCACCAGCA / 5'-ACCCGTATTCCAGCAGGTAAGCGA	Presente estudio
19M	<i>cry 19</i>	291	59.2	5'-CGAGGAAGCTTCTTATGCATCTTCAGG/ 5'-CACGCAGCGAGAGCTCGGTTAT	Presente estudio

^a Los pares de oligonucleótidos seguidos del sufijo M corresponden al método de PCR múltiple.

5.1.6 Análisis de PCR

La concentración y la calidad del ADN cada muestra fue determinada mediante un espectrofotómetro Epoch Sistema Micro-Volumen (Modelo: 255781, BioTek TM, Winooski, VT). Los valores en promedio para las 202 cepas fueron de 3000-3500 ng/μl, a partir de estas muestras se realizó una dilución de 1:100 en agua Milli-Q para usarla directamente como templado para las reacciones de PCR múltiple y convencional. El volumen final de la mezcla de PCR fue de 50 μl, y la concentración de los componentes fue la siguiente: 5 mM dNTP's, 10 mM de cada uno de los cebadores, 1 U de Taq polimerasa con su tampón correspondiente (GenScript, Piscataway, NJ), la PCR se realizó en un termociclador Mastercycler Gradient (Modelo: 950000015, Eppendorf, Enfield, CT), las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un paso de desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C, seguido por 30 ciclos de: desnaturalización durante 30 s a 95 °C, alineamiento durante 45 segundos de temperatura variable en función del par de cebadores (véase la Tabla 5), y extensión durante 1 min a 72 °C, finalmente una etapa de extensión de 7 min a 72 °C. Los productos de PCR fueron separados posteriormente por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

5.1.7 Perfiles de proteínas

De acuerdo con Bel *et al.* (1997), una vez hecha la selección por PCR de siete cepas de *B. thuringiensis*, estas fueron cultivadas en placas de medio LB hasta alcanzar la esporulación (confirmado por microscopía de luz), a continuación dos asadas fueron retirados de la placa y se transfirieron a tubos de ensayo estériles que contenían 1 ml de NaCl al 0.5 M enfriado a 4 °C. Las muestras resuspendidas fueron centrifugadas durante 5 min a 13000 xg y se descartó el sobrenadante, para este gel se incluyó además la cepa de referencia *B. thuringiensis tohokuensis*. Los sedimentos fueron resuspendidos en 140 μl de SDS 1% y 0.01% β-mercaptoetanol, se calentaron a 100 °C durante 10 min para solubilizar los cristales. A continuación las muestras se centrifugaron a 13800 xg durante 10 min y los sobrenadantes se usaron para la electroforesis mediante la mezcla de la muestra con tampón de desnaturalización en volúmenes equivalentes (0.15 M Tris/HCl

pH 8.8, EDTA 3.75 mM, 0.75 M de sacarosa, 0.075% de azul de bromofenol, 2.5% de SDS y 7.4 mM β -mercaptoetanol), luego se calentó la mezcla durante 10 min a 100 °C y se depositó en el en gel de poliacrilamida 10%, posteriormente se separaron las bandas de proteínas en condiciones desnaturalizantes a 35 mA, a continuación una vez terminado el corrimiento, las bandas de proteínas se tiñeron con el reactivo de ensayo de proteínas de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratorios GmbH, München) durante 45 min, y se destiñeron con una solución de 25% de metanol ácido acético 10%.

5.1.8 Preparación de los extractos de *B. thuringiensis* para los bioensayos

Para esto se realizó una extracción con el método de precipitación lactosa acetona de Dulmage *et al.*, (1970). Las siete cepas aisladas que presentaron los genes *cry10* y *cry19* se inocularon en 2 L de caldo nutritivo (extracto de carne de vaca: 3 g, Peptona: 5 g, fórmula por litro), y se incubaron durante 7 días a 30 °C, 250 rpm. La formación óptima de cristales fue corroborada por microscopía de luz.

5.1.9 Bioensayos

Los insectos de *A. ludens* fueron proporcionados por el insectario del Instituto de Biotecnología de la UANL. Para la realización de los bioensayos, cada unidad experimental constó de: 20 moscas adultas (2 días de edad, 10 machos y 10 hembras) las cuales se depositaron en un vaso de plástico transparente de 1 litro de capacidad con un tejido de malla en el borde el cual se sujetó con una liga de látex, todas las moscas fueron alimentadas con 20 gramos de dieta sólida Shorey (Shorey y Hale 1965). Los tratamientos se aplicaron siguiendo la metodología de Vidal-Quist *et al.* (2009), con algunas modificaciones. A partir del extracto procedente de la precipitación por lactosa-acetona, se realizó una mezcla usando como solución base de sacarosa al 10%, para tener una concentración de uso de 50 mg/ml de los cristales parasporales de cada una de las siete cepas, a continuación se depositaron 50 μ l de esta mezcla por unidad experimental, diariamente durante siete días, para los controles negativos solo se usó

sacarosa al 10%. Los bioensayos se realizaron bajo condiciones controladas de 25 °C temperatura ambiente y fotoperíodo 16 h: 8 h de luz/oscuridad. La mortalidad se registró al día siete y cada tratamiento se hizo por triplicado (Buentello-Wong *et al.*, 2015).

5.1.10 Análisis de los datos

Los porcentajes de mortalidad fueron analizados mediante análisis unidireccional de varianza (ANOVA, $P = 0.05$) y comparación de medias de Tukey a un nivel de significancia de $P < 0.05$. Si en dado caso se observó mortalidad en el grupo control, la mortalidad de los tratamientos fue corregida usando la fórmula de Abbott (1925); % mortalidad corregida = $[(\% \text{ mortalidad muestra} - \% \text{ mortalidad testigo}) / (100 - \% \text{ mortalidad testigo}) * 100]$.

5.2 Caracterización y evaluación de la toxicidad de aceites esenciales de plantas en adultos de la mosca Mexicana de la fruta

5.2.1 Aceites esenciales (AEs)

Usamos los aceites esenciales de cuatro especies de Eucalipto: *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus dives* y *Eucalyptus staigeriana*; (Myrtaceae), Nim: *Azadirachta indica* (Meliaceae), Lavanda: *Lavandula angustifolia* (Lamiaceae), Clavo: *Eugenia caryophyllus* (Myrtaceae), Albahaca: *Ocimum basilicum* (Lamiaceae), Tomillo: *Thymus vulgaris* (Lamiaceae) y Salvia romana: *Salvia sclarea* (Lamiaceae), los cuales fueron muestras comerciales de Oils4life Limited (Norfolk, UK), los AEs de: *E. globulus*, *E. citriodora*, y *E. dives* fueron extraídos por destilación de vapor de las hojas frescas o parcialmente secas y ramas jóvenes. El AE de *E. staigeriana* fue extraído por destilación de vapor de la madera y las hojas. El aceite *A. indica* fue obtenido mediante prensado en frío y refinado a partir de las semillas del árbol. El AE de *L. angustifolia* fue obtenido de la extracción etanólica de la masa semi-sólida obtenida por la extracción del solvente del material fresco de la planta. El AE de *E. caryophyllus* fue extraído por destilación acuosa de los brotes y hojas de la planta, y por destilación de vapor de los

tallos. El AE de *O. basilicum* fue obtenido por destilación de vapor de los brotes florales. El AE de *T. vulgaris* fue extraído por medio de vapor o destilación acuosa de las hojas frescas o parcialmente secas y a partir de los botones florales. El AE de *S. sclarea* fue obtenido por destilación de vapor de los brotes florales y hojas.

5.2.2 Cromatografía de Gases

El análisis cualitativo se realizó por el método propuesto por Martínez-Velázquez *et al.* (2011), fue realizado con un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard Modelo 5890 serie II (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA), acoplado a un detector selectivo de masas Hewlett-Packard Modelo 5972. La separación fue llevada a cabo en una columna capilar FFAP de polietilenglicol (50 m x 0,2 mm ID x 0,33 micras de espesor de película). Las interfaces de inyector y espectrómetro de masas (MS) se procesaron a 250 °C y 280 °C, respectivamente. La temperatura del horno inicial fue 75 °C, a continuación, fue aumentada a 220 °C a una velocidad de 2.5 °C/min y mantenida durante 10 min. El gas portador fue helio a un caudal 0,8 ml/min. Volumen de inyección fue 0.1 ml se usó una relación de división 1:200. El espectrómetro de masas fue operado en el modo SCAN con un voltaje de ionización de 70-eV, escaneo de 30-350 m/z en 0.81 escaneos/s. Los compuestos volátiles fueron identificados con los siguientes criterios: (1) la comparación de los espectros de masas con la biblioteca Wiley de espectros 275 L (Rev. C.00.00) base de datos electrónica; (2) la inyección de compuestos auténticos de Sigma-Aldrich con una pureza mínima del 95% en las mismas condiciones analíticas; y por (3) Comparación del índice de retención en fases similares, como se reportó en la literatura. Los compuestos volátiles de los aceites esenciales se cuantificaron por cromatografía de gases (GC) con detección de ionización de llama con un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard serie 6890 provisto de un muestreador automático. Condiciones cromatográficas fueron las mismas que el análisis GC-MS con flujo de aire e hidrógeno a una velocidad de 400 y 40 ml/min, respectivamente. La cuantificación se hizo para el por ciento de área en la muestra mediante la adopción de los datos automáticos de integración electrónica con un Software HP Chemstation, Versión B.01.00.

5.2.3 Cría de Insectos

Los insectos de *A. ludens* fueron generosamente provistos por el insectario del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) en Nuevo León México, los cuales se encuentran bajo condiciones controladas a 25°C y fotoperiodo 16 h: 8 h luz/obscuridad. Las moscas fueron alimentadas con una dieta solida Shorey (Shorey and Hale 1965), y una solución de sacarosa al 10%.

5.2.4 Valoración de la toxicidad por ingestión

Cada unidad experimental para los bioensayos consistió de: 20 moscas adultas (Dos días de edad, 10 machos y 10 hembras) estas fueron depositadas en un vaso transparente de plástico de un litro de capacidad con una malla en la punta del vaso, las moscas fueron alimentadas *ad libitum* con varias concentraciones de cada uno de 10 los aceites esenciales (0.5% hasta 7.5% p/v), las diluciones fueron hechas en una solución de sacarosa al 10% p/v al cual se le adicionó 1% v/v de tween 20 para asegurar la emulsión, las diluciones se colocaron en una copa de plástico de 24 ml de capacidad al cual se le realizó un hoyo en la tapa y le fue colocado un pedazo de algodón para permitir a las moscas alimentarse de la emulsión sin ahogarse, así mismo fueron alimentadas con 20 gramos de dieta solida Shorey (Shorey and Hale 1965). La mortalidad fue registrada cada día durante siete días. Cada tratamiento fue realizado por triplicado.

5.2.5 Análisis Estadístico

Los valores de mortalidad fueron corregidos con la fórmula de Abbott (1925), si se observó mortalidad en el grupo control. Se analizaron las diferencias significativas entre los rendimientos de los aceites esenciales mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA), las medias fueron separadas por medio de la prueba Tukey-Kramer (Sokal y Rohlf, 1981), y se usó un nivel de probabilidad de $P < 0.05$ para la significancia entre medias. Para la estimación de los valores de concentración letal al 50% y 90% (CL50 y

CL90) se realizó un análisis de probit, de igual manera para estimar los límites fiduciales del 95% de confiabilidad, la χ^2 , la pendiente de la recta, el valor p y los grados de libertad (Finney, 1952). Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico de SPSS 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA 2004).

5.3 Comparación de la actividad bioinsecticida del conjunto cristales parasporales y los aceites esenciales botánicos en la mosca Mexicana de la fruta.

5.3.1 Solubilización de las proteínas Cry

Las proteínas parasporales fueron solubilizadas en base a la metodología de Naimov *et al.* (2008). Se centrifugó el contenido de 4 litros de crecimiento de caldo CTP, de las siguientes cepas: HD1, HD199, HD500 y HD567, durante 5000 xg por 5 min., posteriormente se descartó el sobrenadante y la pastilla fue lavada con NaCl 1M, seguido por una centrifugación a 7000 xg por 5 min., después se descartó el sobrenadante y se realizaron dos lavados de la pastilla con NaCl 1M/ EDTA 5 mM a 4 °C mediante centrifugación a 5000 xg durante 5 min., consiguientemente se lavó la pastilla en buffer KCl 10 mM y fue descartado el sobrenadante. Finalmente la pastilla fue resuspendida en buffer de carbonatos (50 mM NaCO₃, 10 mM Ditiotritol), y se incubó por 2 horas/ 150 rpm a temperatura ambiente (25 °C), posteriormente fue centrifugado el contenido a 14000 xg por 10 min., y se colectó el sobrenadante para su posterior utilización en los bioensayos.

5.3.2 Realización de los Bioensayos

Para esto fueron empleadas las metodologías descritas en las secciones 5.1.9 y 5.2.4. En cuanto a las cepas HD, se usó una concentración de 10 mg/ml de proteínas Cry solubilizadas, a las cuales se les realizó una depuración de sales por medio de diálisis, las proteínas Cry solubilizadas y dializadas provenientes de las cepas: HD1, HD199, HD500, y HD567 fueron cuantificadas por la metodología de Bradford (1976), a las

cuales posteriormente se les agregó 10% de sacarosa. Una vez cuantificadas las proteínas, se procedió a administrarse en conjunto con la CL50 de los siguientes aceites esenciales: *E. caryophyllus*, *T. vulgaris*, *O. basilicum*, *E. citriodora*, *L. angustifolia*, *E. dives*, y *E. staigeriana*, los cuales presentaron los siguientes valores expresados en % p/v: 0.35, 0.53, 0.81, 1.26, 1.68, 2.20, y 3.22 respectivamente. La mortalidad fue registrada cada día durante siete días. Las unidades experimentales se realizaron por triplicado. Paralelamente realizamos bioensayos con cada uno de los AE y las proteínas Cry solubilizadas de forma individual como punto de comparación, para sumar en total 39 tratamientos los cuales incluyeron 28 combinaciones, y 11 tratamientos individuales, sin contar los controles negativos los cuales consistieron de agua destilada más 10% de sacarosa y 1% de tween 20, en conjunto con 20 gramos de dieta sólida Shorey (Shorey y Hale 1965).

5.3.3 Análisis Estadístico

Los valores de mortalidad fueron corregidos con la fórmula de Abbott (1925) cuando se observó mortalidad en el grupo control. Las diferencias significativas entre los rendimientos de los aceites esenciales se determinaron mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA), las medias fueron separadas por una prueba de Tukey-Kramer (Sokal y Rohlf, 1981), y fue usado el nivel de probabilidad de $P < 0.05$ para la significancia entre medias. Todos los análisis fueron hechos con el paquete estadístico de SPSS 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA 2004).

5.3.4 Grado de Interacción entre Bioplaguicidas

Para determinar el grado de interacción entre bioplaguicidas se usó la siguiente terminología (Polanczyk y Alves 2005):

- 1.- Sinergismo Independiente: Es un sistema donde los dos componentes actúan independientemente, sin interferencia entre ellos. La mortalidad (%) resultante de esta sinergia puede ser expresada así: $A_{1+2} = A_1 + A_2 (1 - A_1 / 100)$, donde A_1 y A_2 corresponden a la mortalidad causada por los agentes 1 y 2, respectivamente.
- 2.- Sinergia Adicional: Es un sistema con dos componentes efectivos, que juntos producen un mayor efecto que la suma de los efectos independientes ($A_{1+2} > A_1 + A_2$).
- 3.- Sinergismo Sub Aditivo: Es un sistema donde los dos componentes actúan juntos producen un efecto mayor que el sinergismo independiente, pero menos que la suma de los efectos individuales.
- 4.- Efecto Aditivo: Es un sistema en donde los dos componentes actúan juntos producen un ligero incremento en su efecto, para el desempeño individual de los componentes, pero no suficiente para ser considerado sinergismo.
- 5.- Antagonismo: Es un sistema donde la interacción de los elementos produce un efecto menor que los rendimientos individuales. En este caso, la interacción es considerada negativa, mientras que los ejemplos anteriores, son considerados positivos.

6. RESULTADOS

6.1 Análisis y determinación de la mortalidad de cepas nativas y de referencia de *B. thuringiensis*

6.1.2 Clasificación de las cepas de bacilos a partir de las muestras de suelo

La morfología microscópica que mostraron las 202 cepas de *B. thuringiensis* resultó en una variedad de cristales los cuales consistieron en: ovoide, pleomórfico, y adherido a la espora, principalmente, con un índice de Bt de 0.66, (el índice de Bt se calculó como el número de cepas de Bt identificados dividido por el número total de cepas de Bacilos examinadas). Del total de cepas formadoras de cristales, 51% produjo los cristales de tipo ovoide, 28% adherido a la espora, 15% de tipo pleomórfico, 3% tipo bipiramidal, 2% de tipo cúbico, y 1% de tipo piramidal (Figura 4). Es evidente que los bacilos de cristales ovalados y redondos son predominantes en el suelo de la región donde se tomaron las muestras en el estado de Nuevo León, México.

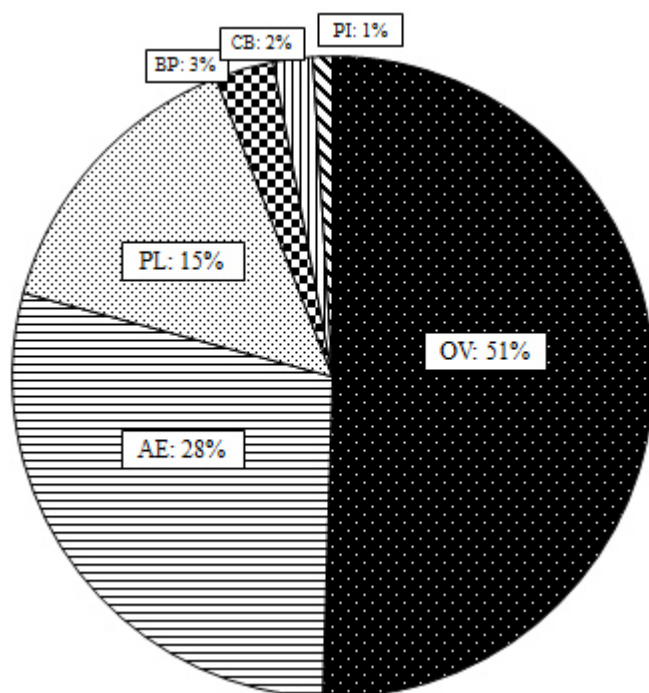


Figura 4. Clasificación morfológica de las 202 cepas aisladas, estas fueron clasificadas en base a la morfología del cristal; OV: Ovoide (51%), AE: Adherido a la espora (28%), PL: Pleomórfico (15%), BP: Bipiramidal (3%), CB: Cúbico (2%), PI: Piramidal (1%).

6.1.3 Caracterización molecular de las cepas aisladas mediante PCR.

Hemos combinado los métodos moleculares y fisiológicos para lograr este objetivo. Los estudios microbiológicos y fisiológicos básicos mostraron un alto grado de aislamiento, así como la detección de los genes *cry* presentes. De las 202 cepas analizadas por PCR, 10 resultaron positivas para dos de los cinco genes analizados por PCR múltiple (*cry2*, *cry4*, *cry10*, *cry11*, *cry19*), realizamos una PCR punto final para cada una de las 10 muestras positivas con los cebadores reportados en la literatura (Carozzi *et al.* 1991, Ejiofor y Johnson 2002), seleccionamos 7 cepas que mostraron una sola banda correspondiente al tamaño esperado (Figura 5) para su posterior análisis, caracterizamos los cristales presentes por microscopía de luz (Tabla 6). Además, analizamos el contenido parasporal de las cepas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, Figura 6).

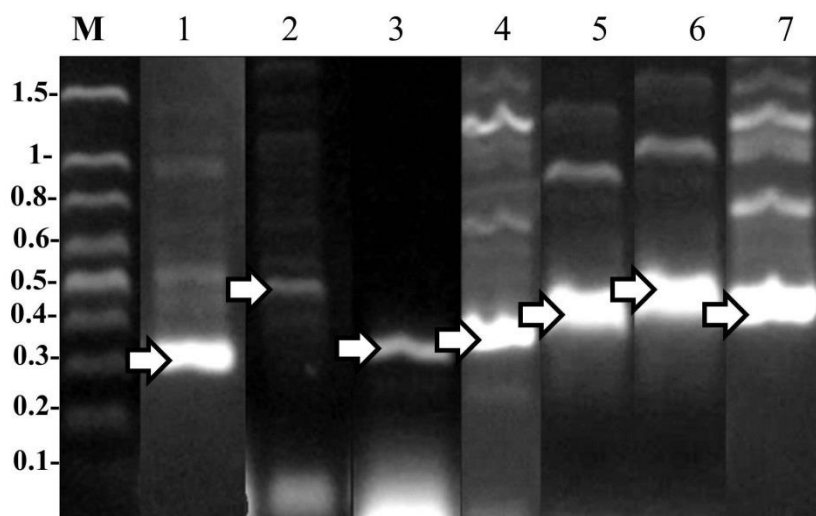


Figura 5. Gel de agarosa al 1% muestra los productos de la PCR convencional. La flecha en cada banda indica el tamaño esperado. Carril: 1.- cepa IB-00084 (*cry10*); 2.- cepa IB-00086 (*cry10*); 3.- cepa IB-00107 (*cry19*); 4.- cepa IB-00108 (*cry10*); 5.- cepa IB-00110 (*cry10*); 6.- cepa IB-00279 (*cry10*); 7.- IB-00282 (*cry10*). Los tamaños del marcador de talla molecular (M) se encuentran en Mb (100 bp DNA Ladder, GenScript, Piscataway, NJ): 1.5, 1, 0.8, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1.

Tabla 6. Clasificación morfológica de las 7 cepas de Bt seleccionadas por PCR

Cepa	Morfología del Cristal	Amplificación del gen <i>cry</i>
IB-00084	Redondo Pequeño	<i>cry10</i>
IB-00086	Redondo Pequeño	<i>cry10</i>
IB-00107	Redondo Pequeño, Pleomórfico	<i>cry19</i>
IB-00108	Pleomórfico	<i>cry10</i>
IB-00110	Redondo Pequeño	<i>cry10</i>
IB-00279	Redondo Pequeño	<i>cry10</i>
IB-00282	Ovoide	<i>cry10</i>

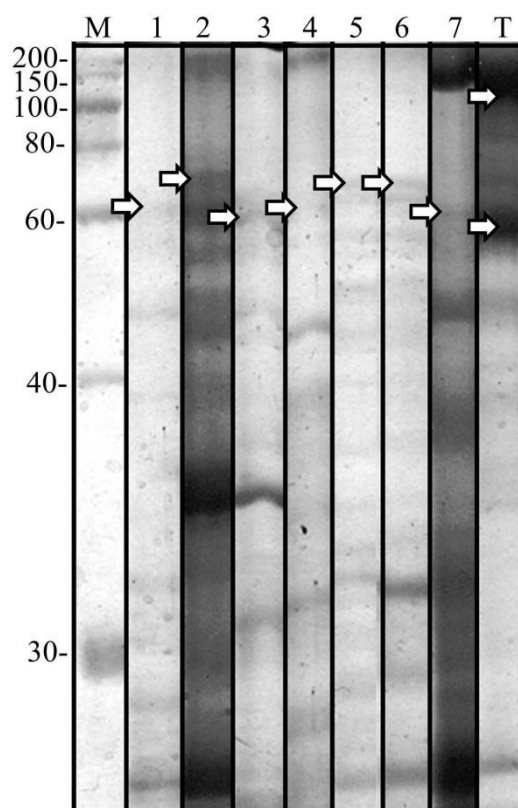


Figura 6. Gel de poliácridamida del 10% donde se muestra el perfil de espora-cristal de las cepas 1-7 (IB-00084, IB-00086, IB-00107, IB-00108, IB-00110, IB-00279, IB-00282), seleccionadas por PCR, la flecha en cada banda indica el tamaño esperado de la proteína Cry. Los tamaños del marcador de talla molecular se encuentran kDa (Smart Advanced Broad-Range Protein Standard, GenScript, Piscataway, NJ): 200, 150, 100, 80, 60, 40, 30; T: *Bt ssp tohokuensis* la cual presenta las proteínas Cry2 (70 kDa) y Cry4 (130 kDa).

Seleccionamos siete cepas; 6 resultaron positivas para el gen *cry10* y una de éstas para el gen de *cry19*. Descartamos la posibilidad de redundancia entre las 6 cepas amplificaron positivo para *cry10* ya que el perfil de proteínas por SDS-PAGE (Tabla 7) era diferente para cada una de las cepas.

Tabla 7. Perfiles proteicos de la mezcla de esporas y cristales obtenidos por el método de SDS-PAGE de las siete cepas seleccionadas por PCR, y una cepa de referencia (*Bt. tohokuensis*)

Cepa Seleccionada	Tamaños del patrón de bandas (kDa)
IB-00084	60, 50, 40
IB-00086	200, 60, 55, 35
IB-00107	60, 50, 35, 32
IB-00108	200, 45, 33
IB-00110	62, 55, 45
IB-00279	62, 55, 45, 33
IB-00282	150, 50, 40
<i>Bt tohokuensis</i>	130, 70

6.1.4 Bioensayos.

Determinamos la mortalidad de siete cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*: IB-00084, IB-00086, IB-00107, IB-00108, IB-00110, IB-00279 y IB-00282, las cuales fueron seleccionadas mediante PCR, la mortalidad máxima presentada fue de 30%, por la cepa IB-00107, después de 7 días de ingestión de los cristales parasporales provenientes de los precipitados de lactosa acetona a una concentración de 50 mg/ml (Fig. 7). También determinamos la mortalidad de cuatro cepas de referencia de *Bacillus thuringiensis* pertenecientes a la colección Howard Dulmage: HD1, HD199, HD500 y HD567, realizamos bioensayos con 4 concentraciones, que fueron las siguientes: 25 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml, y 150 mg/ml, los valores de mortalidad para estas cepas resultó ser menor de lo esperado, los cuales oscilaron entre 5-10% para la concentración de 25 mg/ml, y 20 a 40% de mortalidad para la concentración de 150 mg/ml (Tabla 8). Debido a los resultados de mortalidad bajos, decidimos usar las proteínas solubilizadas, las cuales mostraron mejores resultados, en este caso se usaron 3 concentraciones; 10 mg/ml, 20 mg/ml y 30 mg/ml. De las cepas HD1, HD199, HD500 y HD567; presentaron 67%, 75%, 35%, y 60% de mortalidad respectivamente con proteínas Cry solubilizadas (Tabla 9), a la concentración 30 mg/ml.

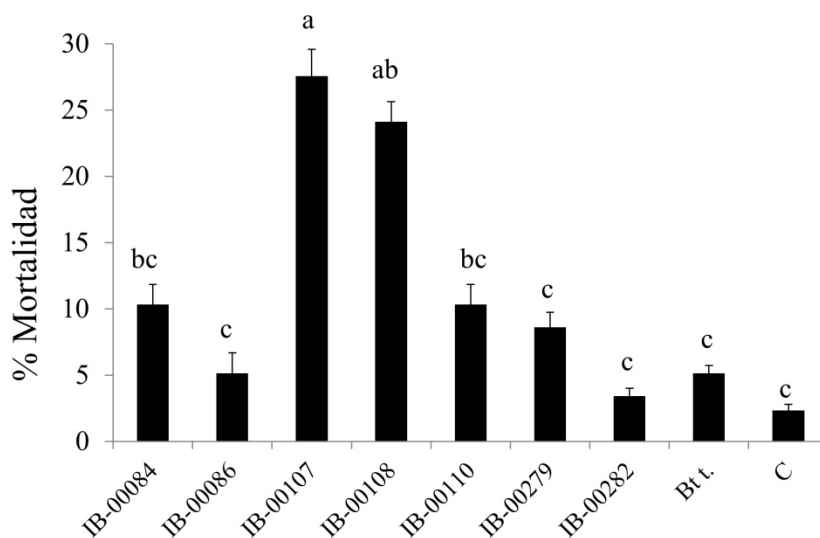


Figura 7. Porcentaje de mortalidad de adultos de *A. ludens* registrados después de siete días de tratamiento con los cristales parasporales (método de Dulmage *et al.*, 1970) de las cepas de Bt seleccionadas por PCR; Bt t.: *B. thuringiensis Tohokuensis*; C: Control negativo. Los datos están presentados como medias \pm DE, y fueron analizados por un ANOVA de una vía seguido por una comparación de medias de Tukey.

Tabla 8. Evaluación de la toxicidad de proteínas Cry parasporales provenientes de precipitación lactosa/acetona, de cuatro cepas de referencia, registrados al séptimo día de bioensayo

Toxicidad por Ingestión - Mortalidad % \pm DE					
mg/mL	HD1	HD199	HD500	HD567	C
25	11.67 \pm 0.58ab	10.00 \pm 1.00ab	6.67 \pm 1.15ab	15.00 \pm 1.00a	1.67 \pm 0.58b
50	15.00 \pm 1.00ab	18.33 \pm 1.15a	16.67 \pm 0.58a	20.00 \pm 1.00a	3.33 \pm 0.58b
100	18.33 \pm 1.15ab	23.33 \pm 2.08a	25.00 \pm 0.00a	30.00 \pm 1.00a	3.33 \pm 1.15b
150	21.67 \pm 0.58b	33.33 \pm 1.15a	33.33 \pm 1.15a	40.00 \pm 0.00a	5.00 \pm 0.00c

Los porcentajes seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes Tukey-Kramer ($P < 0.05$).

Tabla 9. Evaluación de la toxicidad de proteínas Cry parasporales solubilizadas provenientes de cuatro cepas de referencia, registrados al séptimo día de bioensayo

Toxicidad por Ingestión - Mortalidad % \pm DE					
mg/mL	HD1	HD500	HD567	HD199	C
10	36.67 \pm 1.53ab	18.33 \pm 0.58cd	23.33 \pm 1.53bc	38.71 \pm 1.00a	3.23 \pm 0.58d
20	58.33 \pm 3.21a	30.00 \pm 1.00b	46.67 \pm 1.53ab	65.00 \pm 1.00a	5.00 \pm 1.00c
30	66.67 \pm 3.06a	35.00 \pm 1.00b	60.00 \pm 1.00a	75.00 \pm 1.00a	3.33 \pm 0.58c

Los porcentajes seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes Tukey-Kramer ($P < 0.05$).

6.2 Análisis y determinación de la mortalidad de varios aceites esenciales de plantas

6.2.1 Toxicidad por ingestión de diez aceites esenciales

Siete de los diez aceites esenciales de plantas utilizados en este estudio, mostraron toxicidad en adultos de *A. ludens*, los cuales presentan una mortalidad proporcional a la concentración ingerida (Fig. 8). A una concentración de 1.5% (p/v) solo *E. caryophyllus* mostró mortalidad de 100%, los demás AEs mostraron porcentajes de mortalidades menores al 90% a esta concentración, los bioensayos tuvieron una duración de siete días para todos los aceites esenciales, excepto el de *E. caryophyllus* que fue de cuatro días, esto debido a su alta toxicidad. Solo tres AEs de los siete presentan una mortalidad mayor al 50% a una concentración de 1% p/v; *E. caryophyllus*, *T. vulgaris*, y *O. basilicum*. A la concentración de 0.5% (p/v), solo *E. caryophyllus* y *T. vulgaris* mostraron una mortalidad mayor al 50% (Tabla 10). A una concentración de 1% (p/v) los siguientes AEs en alcanzar la mortalidad de 50% fueron: *O. basilicum* y *E. citriodora*, a la concentración de 2.5% los siguientes AEs en alcanzar la mortalidad de 50% fueron: *L. angustifolia* y *E. dives*. Y por último a la concentración de 6.5% (p/v) el siguiente aceite en alcanzar la mortalidad de 50% fue el de *E. staigeriana* (Tabla 10). En orden de mayor a menor toxicidad: *E. caryophyllus*, *T. vulgaris*, *O. basilicum*, *E. citriodora*, *L. angustifolia*, *E. dives*, y *E. staigeriana*, con una CL50 (% p/v) de: 0.35, 0.53, 0.81, 1.26, 1.68, 2.20, y 3.22 respectivamente (Tabla 11).

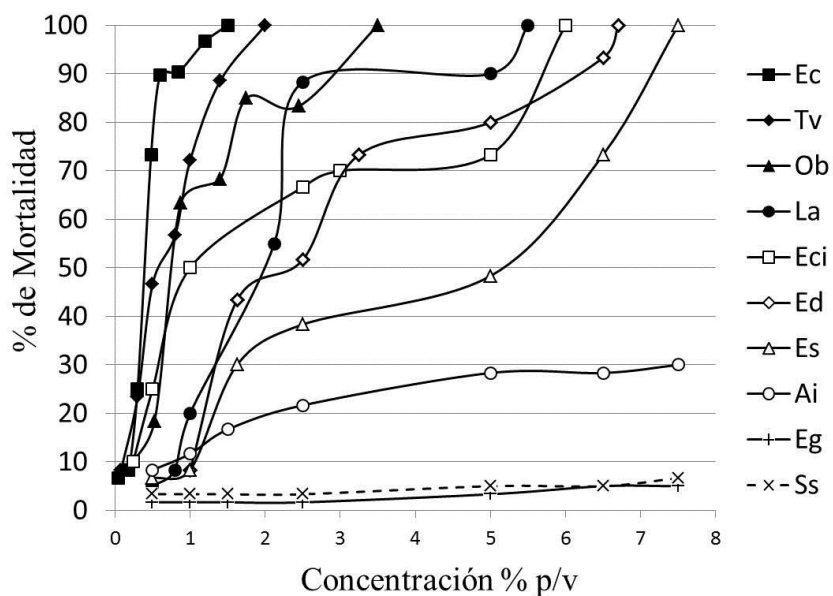


Figura 8. Relación dosis mortalidad de diferentes aceites esenciales de plantas; Ec: *E. caryophyllata*; Tv: *T. vulgaris*; Ob: *O. basilicum*; La: *L. angustifolia*; Eci: *E. citriodora*; Ed: *E. dives*; Es: *E. staigeriana*; Ai: *A. indica*; Eg: *E. globulus*; Ss: *S. sclarea*.

En base a la información de la caracterización del aceite esencial de *E. caryophyllus*, decidimos realizar un bioensayo con Eugenol de 99% de pureza (Sigma-Aldrich Chemical Co., Steinheim, Alemania), y determinamos que la alta toxicidad del AE de *E. caryophyllus* se debe al eugenol, este componente presenta por sí mismo una CL50 (0.17% p/v) dos veces más toxica que el AE (Tabla 12).

Tabla 10. Resultados de las pruebas de ingestión de los AEs a siete concentraciones diferentes en adultos de *Anastrepha ludens* registrados al séptimo día de bioensayo.

Toxicidad por Ingestión - Mortalidad % \pm DE							
Aceite esencial	0.5% (p/v) de AE	1.0% (p/v) de AE	1.5% (p/v) de AE	2.5% (p/v) de AE	5.0% (p/v) de AE	6.5% (p/v) de AE	7.5% (p/v) de AE
<i>E. caryophyllata</i> *	65 \pm 3.61a	88.33 \pm 1.53a	100 \pm 0a	100 \pm 0a	100 \pm 0a	100 \pm 0a	100 \pm 0a
<i>T. vulgaris</i>	56.67 \pm 3.06a	73.33 \pm 2.52ab	90 \pm 2a	100 \pm 0a	100 \pm 0a	100 \pm 0a	100 \pm 0a
<i>O. basilicum</i>	18.33 \pm 2.08b	63.33 \pm 0.58bc	68.33 \pm 1.15b	83.33 \pm 0.58ab	100 \pm 0a	100 \pm 0a	100 \pm 0a
<i>E. citriodora</i>	25 \pm 1b	50 \pm 2c	55 \pm 1b	66.67 \pm 0.58bc	73.33 \pm 4.51bc	100 \pm 0a	100 \pm 0a
<i>L. angustifolia</i>	5 \pm 1b	20 \pm 2d	40 \pm 1c	88.33 \pm 3.21a	90 \pm 2.65ab	100 \pm 0 a	100 \pm 0a
<i>E. dives</i>	3.33 \pm 0.58b	8.33 \pm 0.58d	38.33 \pm 0.58c	51.67 \pm 2.08cd	80 \pm 1.73ab	93.33 \pm 1.15ab	100 \pm 0a
<i>E. staigeriana</i>	6.67 \pm 0.58b	8.33 \pm 0.58d	30 \pm 1cd	38.33 \pm 2.08de	48.33 \pm 0.58cd	73.33 \pm 4.04b	100 \pm 0a
<i>A. indica</i>	8.33 \pm 1.53b	11.7 \pm 0.58d	16.67 \pm 0.58de	21.67 \pm 0.58ef	28.33 \pm 1.15de	28.33 \pm 1.15c	30 \pm 1b
<i>E. globulus</i>	1.67 \pm 0.58b	1.67 \pm 0.58d	1.67 \pm 0.58f	1.67 \pm 0.58f	3.33 \pm 1.15e	5 \pm 1d	5 \pm 1c
<i>S. sclarea</i>	3.33 \pm 0.58b	3.33 \pm 0.58d	3.33 \pm 0.58ef	3.33 \pm 0.58f	5 \pm 0e	5 \pm 0d	6.67 \pm 0.58c

Los porcentajes seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes Tukey-Kramer ($P < 0.05$).

*Los resultados de mortalidad fueron registrados al cuarto día de bioensayo.

Tabla 11. Concentraciones letales (CL50 y CL90), de los diferentes aceites esenciales en una población de laboratorio de *Anastrepha ludens*

AE*	N ^a	CL50 (IC) ^{bc}	CL90 (IC) ^{bc}	Pendiente ± EE	χ^2	Valor P (GL)	Día ^d
Ec	490	0.35 (0.32-0.39)a	0.78 (0.67-0.90)a	2.79 ± 0.26	90.49	0.000 (6)	4
Tv	422	0.53 (0.46-0.62)b	1.81 (1.42-2.31)b	1.80 ± 0.19	16.98	0.005 (5)	7
Ob	420	0.81 (0.70-0.93)c	2.58 (2.07-3.22)b	1.88 ± 0.19	19.23	0.002 (5)	7
Eci	420	1.26 (1.03-1.53)d	7.61 (5.32-0.89)cd	1.22 ± 0.12	16.26	0.006 (5)	7
La	420	1.68 (1.51-1.86)d	3.67 (3.11-4.33)b	2.80 ± 0.24	17.77	0.003 (5)	7
Ed	420	2.20 (1.98-2.45)e	5.42 (4.57-6.42)c	2.44 ± 0.23	12.11	0.033 (5)	7
Es	420	3.22 (2.79-3.70)f	11.60 (8.74-15.41)d	1.71 ± 0.16	29.22	0.000 (5)	7

*Aceite esencial (AE), *Eugenia caryophyllus* (Ec), *Ocimum basilicum* (Ob), *Thymus vulgaris* (Tv), *Lavandula angustifolia* (La), *Eucalyptus citriodora* (Eci), *Eucalyptus dives* (Ed), *Eucalyptus staigeriana* (Es).

^a Número de moscas adultas bioensayadas.

^b CL50 y CL90 representan la concentración de (% p/v) requeridos para matar 50% y 90% de las moscas adultas, respectivamente; Intervalos de Confianza (ICs) 95% se muestran en paréntesis.

^c Diferencia estadística significativa en las CL50 y CL90 entre los diferentes aceites esenciales, valor obtenido a partir del solapamiento de los ICs 95%, los IC que comparten la misma letra no presentan diferencia significativa

^d Día en el cual se registró el 100% de la mortalidad a la concentración más alta.

Tabla 12. Comparación entre la CL50 y CL90 del Eugenol y el AE de *E. caryophyllus*

ID	N ^a	CL50 (IC) ^b	CL90 (IC) ^b	Pendiente ± EE	χ^2	Valor P (GL)
<i>E. caryophyllus</i>	490	0.35 (0.32-0.39)b	0.78 (0.67-0.90)a	2.79 ± 0.26	90.50	0.000 (6)
Eugenol	420	0.17 (0.15-0.21)a	1.08 (0.68-1.70)a	1.21 ± 0.15	25.93	0.000 (5)

^a Número de moscas adultas bioensayadas.

^b CL50 y CL90 representan la concentración de (% p/v) requeridos para matar 50% y 90% de las hembras adultas, respectivamente; ICs 95% se muestran en paréntesis.

6.2.2 Análisis cromatográfico de aceites esenciales

Para la determinación de los componentes de tres de los aceites esenciales más tóxicos en los adultos de *A. ludens*; *Eugenia caryophyllus* (Ec), *Ocimum basilicum* (Ob) y *Thymus vulgaris* (Tv), realizamos un análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas. Un total de 89 componentes fueron identificados en los tres AEs, contabilizando un 96-97% de la composición total (Tabla 13). Los componentes principales de los AE de *Eugenia caryophyllus* fueron: eugenol (77.58%), acetyleugenol (10.99%) y β -cariofileno (6.22%), mientras que para *Thymus vulgaris* los principales componentes fueron timol (36.85%), p-cimeno (32.49%), α -terpineol (12.58%) y α -pineno (2.18%). En el caso de *Ocimum basilicum* los más característicos fueron: estragol (72.64%), linalool (16.65%), cis- α -bisaboleno (1.48%) y neral (1.41%). Los AEs de *E. caryophyllus* y *O. basilicum* fueron representado por fenilpropenos (77.58% y 72.63% respectivamente), seguido por ésteres de benzoato (10.99%) y sesquiterpenos (6.22%) para *E. caryophyllus*, y monoterpenos (16.65%) para *O. basilicum*. En el caso de *T. vulgaris* el AE fue dominado por monoterpenos (89.39%).

Tabla 13. Índice de retención y composición relativa de los componentes químicos mayores de tres aceites esenciales

Componente	KI*	Composición media en % de área			Identificación
		<i>E. caryophyllus</i>	<i>T. vulgaris</i>	<i>O. basilicum</i>	
α-Pino	1,039	0.008	2.177	0.065	KI ^{ab} , MS, STD
Camfeno	1,083	-	0.639	0.007	KI ^{ab} , MS
β -Pino	1,124	-	0.209	0.039	KI ^{ab} , MS, STD
β -Mirreno	1,145	-	0.754	0.033	KI ^{ab} , MS
Limoneno	1,206	0.005	0.622	0.049	KI ^{ab} , MS, STD
1,8-Cineol	1,228	-	0.489	0.357	KI ^{ab} , MS, STD
p-Cimeno	1,272	0.085	32.494	0.316	KI ^{ab} , MS, STD
α -Terpinoleno	1,287	-	0.324	0.006	KI ^{ab} , MS
trans-Linalol-oxido	1,451	-	-	0.143	KI ^{ab} , MS
Camfor	1,518	-	0.366	-	KI ^a , MS
Linalol	1,537	0.017	5.29	16.653	KI ^{ab} , MS, STD
Junipeno	1,572	-	1.212	-	KI ^a , MS
α -Bergamoteno	1,590	-	-	0.737	KI ^a , MS
β-Cariofileno	1,617	6.217	1.173	0.458	KI ^{ab} , MS
4-Terpineol	1,637	-	0.337	-	KI ^a , MS, STD
Estragol	1,655	-	0.797	72.637	KI ^{ab} , MS
Isoborneol	1,660	-	0.419	-	KI ^{ab} , MS
α -Terpineol (Borneol)	1,664	-	-	0.715	KI ^b , MS, STD
α-Humuleno	1,665	0.903	-	-	KI ^{ab} , MS
Verbenol	1,684	-	0.374	-	KI ^b , MS, STD
Neral	1,695	-	-	1.414	KI ^{ab} , MS
α -Terpineol	1,700	-	12.579	-	KI ^a , MS, STD
Germacreno D	1,705	-	-	0.465	KI ^a , MS
β -Bisaboleno	1,714	-	-	0.35	KI ^a , MS
Geranial	1,730	-	-	0.791	KI ^{ab} , MS
(Z)-α-bisaboleno	1,740	-	-	1.477	KI ^a , MS
Timol	2,100	-	36.849	0.082	KI ^b , MS, STD
Eugenol	2,103	77.579	0.307	0.225	KI ^b , MS, STD
Acetileugenol	2,277	10.987	-	-	KI ^b , MS
Chavicol	2,300	0.201	-	0.036	KI ^b , MS
Total		96.00	97.41	97.06	

KI, Índices de retención de Kovats; MS, Espectro de masas; - no detectado; STD, inyección de componente auténtico (Estándar); ^a Davies 1990. ^b Jennings y Shibamoto 1980.

6.3 Comparación de la actividad bioinsecticida del conjunto cristales parasporales y los aceites esenciales botánicos en la mosca Mexicana de la fruta.

Para observar si se presentaba un fenómeno de sinergia entre los aceites esenciales y las proteínas Cry se optó por usar una concentración de 10 mg/ml de las proteínas Cry parasporales solubilizadas, para inducir una mortalidad \leq al 50% (Tabla 9) y la CL50 de cada aceite esencial (Tabla 11). Para determinar si existía diferencia significativa entre la toxicidad presentada por la CL50 de siete aceites esenciales administrados de manera conjunta con los cristales parasporales provenientes de cuatro cepas de referencia, comparado con la mortalidad de los dos anteriores administrados de manera individual, usamos en total 28 combinaciones, incluimos adicionalmente al bioensayo cada uno de los AEs y los cristales parasporales por separado, como punto de comparación. A partir de la tabla 14 hasta la tabla 20 se presenta la evaluación del efecto combinado de la CL50 de cada uno de los siete AEs tóxicos para *A. ludens* (*E. caryophyllus*, *T. vulgaris*, *O. basilicum*, *E. citriodora*, *L. angustifolia*, *E. dives*, y *E. staigeriana*, con una CL50 (% p/v) de: 0.35, 0.53, 0.81, 1.26, 1.68, 2.20, y 3.22 respectivamente) y su conjunto con las proteínas Cry solubilizadas (10 mg/ml) provenientes de cuatro cepas de referencia (HD1, HD500, HD567 y HD199), seguido su respectiva gráfica (Fig. 9-15), la cual muestra la dinámica de mortalidad del efecto combinado a partir del día 1 al 7.

Posteriormente realizamos el análisis de interacción entre las cepas de referencia entomopatógenas de *B. thuringiensis* y los aceites esenciales, encontramos que la mayoría fueron antagonistas, excepto para el AE de *E. caryophyllata* x HD1, HD500, HD567 y HD199, los cuales presentaron efectos aditivos y una interacción de tipo sub-aditiva con la cepa HD567; *T. vulgaris* x HD199, que presentó un efecto aditivo; y *O. basilicum* x HD500 y HD567, de tal forma que la última combinación (*O. basilicum* x HD567), fue la única que presentó una interacción de sinergismo adicional (Tabla 21).

Tabla 14. Evaluación del efecto combinado de la CL50 del AE de *E. caryophyllus* y proteínas Cry parasporales provenientes de cuatro cepas de referencia

Toxicidad por Ingestión - Mortalidad % \pm DE					
Día	AE+HD1	AE+HD500	AE+HD567	AE+HD199	AEi*
3	33.3 \pm 2a	34.4 \pm 1.5a	32.4 \pm 3.8a	36.4 \pm 2.6a	36.5 \pm 4.2a
4	47.6 \pm 2.6a	46.9 \pm 2.6a	47.1 \pm 2.5a	50.0 \pm 3.0a	49.2 \pm 2.5a
5	58.7 \pm 2.9a	56.3 \pm 3.0a	64.7 \pm 3.2a	65.2 \pm 3.5a	58.7 \pm 3.2a
6	69.8 \pm 4.0a	64.1 \pm 3.8a	75.0 \pm 3.0a	75.8 \pm 2.9a	65.1 \pm 4.0a
7	82.5 \pm 2.1a	81.3 \pm 3.8a	91.2 \pm 1.5a	81.8 \pm 2.6a	79.4 \pm 3.8a

*AEi: Aceite esencial individual. Los porcentajes seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes por prueba de Tukey-Kramer ($P < 0.05$).

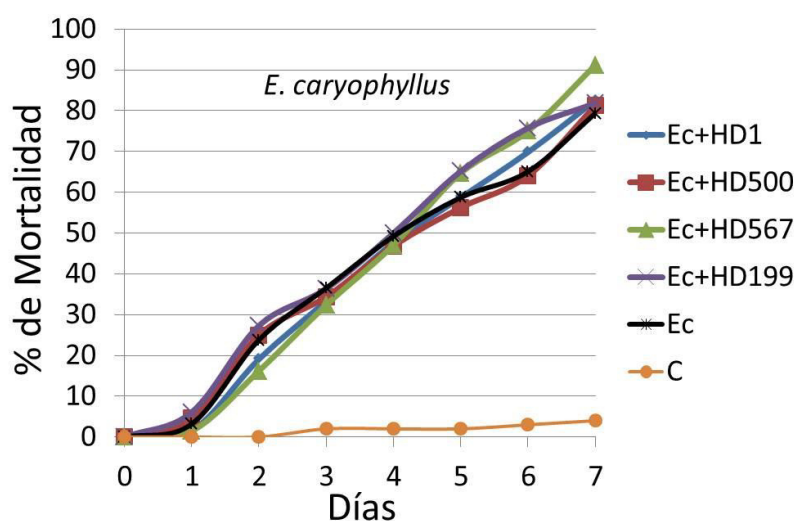


Figura 9. Dinámica del efecto combinado de la CL50 del AE de Clavo (*Eugenia caryophyllus*; Ec) y proteínas Cry parasporales provenientes de cuatro cepas de referencia, con su respectivo control negativo (C).

Tabla 15. Evaluación del efecto combinado de la CL50 del AE de *T. vulgaris* y proteínas Cry parasporales provenientes de cuatro cepas de referencia

Toxicidad por Ingestión - Mortalidad % \pm DE					
Día	AE+HD1	AE+HD500	AE+HD567	AE+HD199	AEi*
3	6.3 \pm 0.6a	12.5 \pm 0.6a	7.4 \pm 0.6a	9.1 \pm 2.0a	1.6 \pm 0.6a
4	14.3 \pm 1.7a	20.3 \pm 2.3a	19.1 \pm 0.6a	16.7 \pm 2.1a	4.8 \pm 1.7a
5	27.0 \pm 4.0a	23.4 \pm 2.6a	27.9 \pm 1.5a	25.8 \pm 4.6a	9.5 \pm 1.7a
6	31.7 \pm 4.0a	28.1 \pm 2.0a	36.8 \pm 3.2a	37.9 \pm 4.2a	22.2 \pm 1.2a
7	34.9 \pm 4.6a	35.9 \pm 1.5a	44.1 \pm 3.0a	56.1 \pm 4.9a	46.0 \pm 2.1a

*AEi: Aceite esencial individual. Los porcentajes seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes por prueba de Tukey-Kramer ($P < 0.05$).

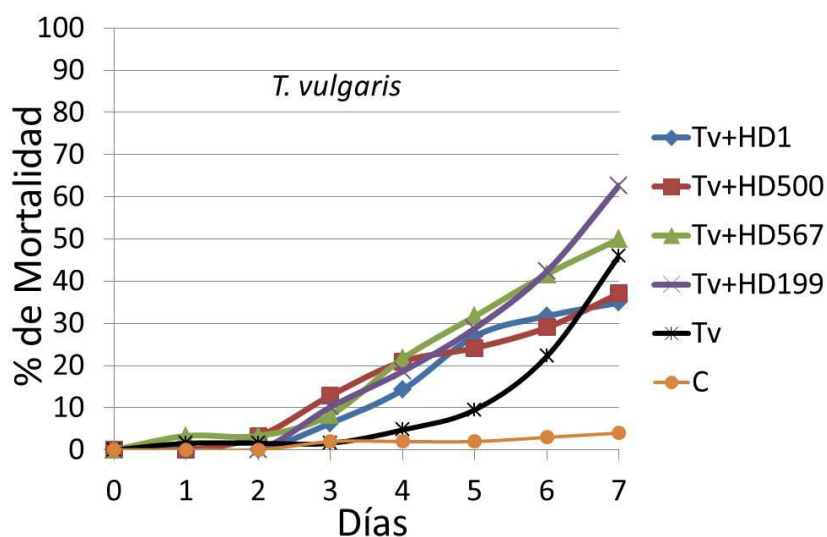


Figura 10. Dinámica del efecto combinado de la CL50 del AE de Tomillo (*Thymus vulgaris*; Tv) y proteínas Cry parasporales provenientes de cuatro cepas de referencia, con su respectivo control negativo (C).

Tabla 16. Evaluación del efecto combinado de la CL50 del AE de *O. basilicum* y proteínas Cry parasporales provenientes de cuatro cepas de referencia

Toxicidad por Ingestión - Mortalidad % \pm DE					
Día	AE+HD1	AE+HD500	AE+HD567	AE+HD199	AEi*
3	3.2 \pm 1.2a	3.2 \pm 1.2a	1.6 \pm 0.6a	3.3 \pm 0.6a	1.5 \pm 0.6a
4	3.2 \pm 1.2b	3.2 \pm 1.2b	23.0 \pm 2.1a	6.6 \pm 0.6b	1.5 \pm 0.6b
5	3.2 \pm 1.2b	7.9 \pm 0.6b	37.7 \pm 1.2a	6.6 \pm 0.6b	9.0 \pm 2.0b
6	12.7 \pm 2.5b	12.7 \pm 1.2b	57.4 \pm 2.5a	9.8 \pm 1.0b	14.9 \pm 2.1b
7	39.7 \pm 0.6b	54.0 \pm 4.0b	83.6 \pm 3.0a	18.0 \pm 0.6b	50.7 \pm 4.5b

*AEi: Aceite esencial individual. Los porcentajes seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes por prueba de Tukey-Kramer ($P < 0.05$).

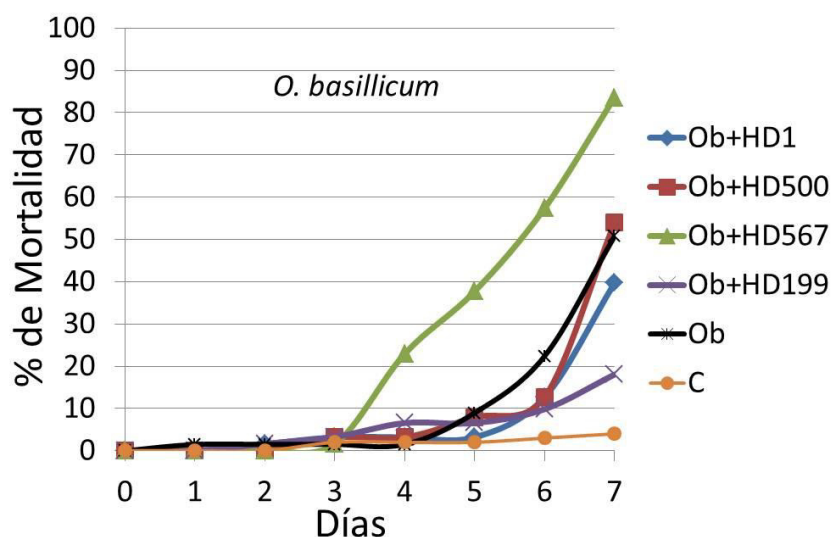


Figura 11. Dinámica del efecto combinado de la CL50 del AE de Albahaca (*Ocimum basilicum*; Ob) y proteínas Cry parasporales provenientes de cuatro cepas de referencia, con su respectivo control negativo (C).

Tabla 17. Evaluación del efecto combinado de la CL50 del AE de *E. citriodora* y proteínas Cry parasporales provenientes de cuatro cepas de referencia

Toxicidad por Ingestión - Mortalidad % \pm DE					
Día	AE+HD1	AE+HD500	AE+HD567	AE+HD199	AEi*
3	7.7 \pm 0.6a	1.6 \pm 0.6a	9.7 \pm 2.0a	4.3 \pm 1.0a	1.7 \pm 0.6a
4	20.0 \pm 0.6ab	12.5 \pm 0.6b	30.6 \pm 2.1ab	36.2 \pm 3.1a	18.3 \pm 0.6b
5	44.6 \pm 2.3a	45.3 \pm 4.7a	67.7 \pm 4.4a	72.5 \pm 2.9a	58.3 \pm 2.5a
6	63.1 \pm 2.1a	56.3 \pm 4.6a	79.0 \pm 5.7a	84.1 \pm 4.0a	81.7 \pm 2.1a
7	78.5 \pm 2.6a	71.9 \pm 2.3a	88.7 \pm 4.0a	89.9 \pm 2.9a	90.0 \pm 1.0a

*AEi: Aceite esencial individual. Los porcentajes seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes por prueba de Tukey-Kramer ($P < 0.05$).

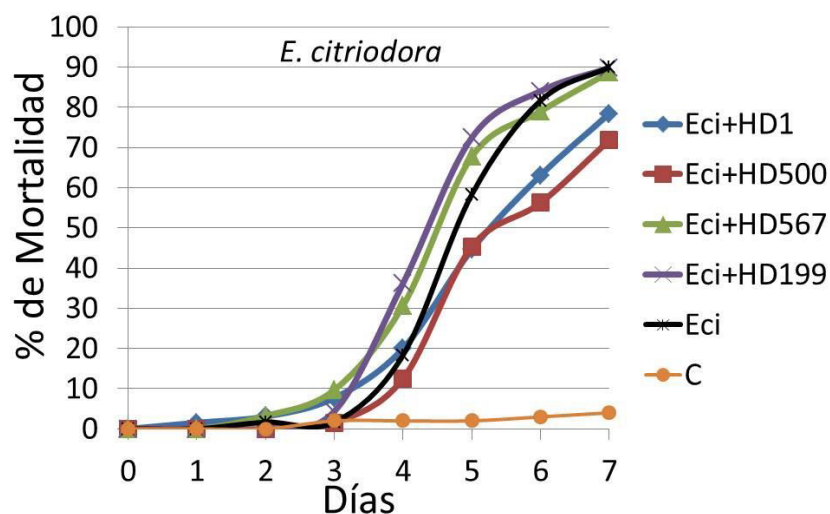


Figura 12. Dinámica del efecto combinado de la CL50 del AE de Eucalipto (*Eucaliptus citriodora*; Eci) y proteínas Cry parasporales provenientes de cuatro cepas de referencia, con su respectivo control negativo (C).

Tabla 18. Evaluación del efecto combinado de la CL50 del AE de *L. angustifolia* y proteínas Cry parasporales provenientes de cuatro cepas de referencia

Toxicidad por Ingestión - Mortalidad % \pm DE					
Día	AE+HD1	AE+HD500	AE+HD567	AE+HD199	AEi*
3	4.9 \pm 1.7a	1.5 \pm 0.6a	12.5 \pm 1.2a	5.1 \pm 1.0a	0.0 \pm 0.0a
4	9.8 \pm 2.0ab	13.2 \pm 1.0ab	35.9 \pm 2.5a	8.5 \pm 1.5b	15.9 \pm 3.1ab
5	26.2 \pm 3.8ab	30.9 \pm 1.7ab	62.5 \pm 0.6a	20.3 \pm 3.5b	40.6 \pm 5.0ab
6	31.1 \pm 4.0b	45.6 \pm 4.0ab	75.0 \pm 2.6a	39.0 \pm 3.1ab	69.6 \pm 3.6a
7	49.2 \pm 3.0c	57.4 \pm 2.6bc	85.9 \pm 1.5ab	61.0 \pm 1.7c	88.4 \pm 2.1a

*AEi: Aceite esencial individual. Los porcentajes seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes por prueba de Tukey-Kramer ($P < 0.05$).

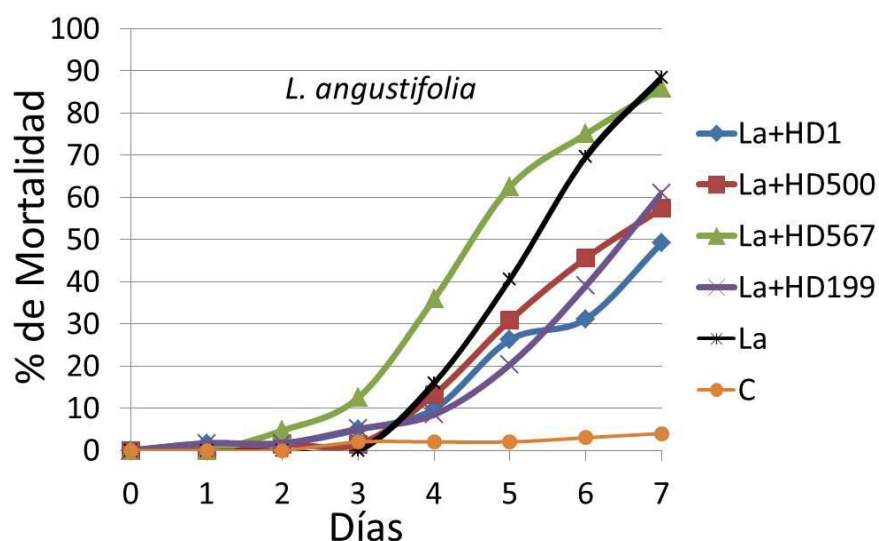


Figura 13. Dinámica del efecto combinado de la CL50 del AE de Lavanda (*Lavandula angustifolia*; La) y proteínas Cry parasporales provenientes de cuatro cepas de referencia, con su respectivo control negativo (C).

Tabla 19. Evaluación del efecto combinado de la CL50 del AE de *E. dives* y proteínas Cry parasporales provenientes de cuatro cepas de referencia

Toxicidad por Ingestión - Mortalidad % \pm DE					
Día	AE+HD1	AE+HD500	AE+HD567	AE+HD199	AEi*
3	15.2 \pm 2.9ab	10.9 \pm 0.6ab	35.9 \pm 2.5a	4.7 \pm 1.0b	5.6 \pm 2.3b
4	19.7 \pm 3.8a	18.8 \pm 1.0a	46.9 \pm 1.0a	12.5 \pm 1.2a	23.9 \pm 3.8a
5	28.8 \pm 3.8a	31.3 \pm 1.2a	48.4 \pm 0.6a	17.2 \pm 0.6a	29.6 \pm 5.2a
6	42.4 \pm 1.5a	42.2 \pm 1.7a	51.6 \pm 1.0a	29.7 \pm 1.5a	53.5 \pm 7.5a
7	62.1 \pm 1.2a	59.4 \pm 2.1a	62.5 \pm 2.1a	64.1 \pm 2.5a	87.3 \pm 6.8a

*AEi: Aceite esencial individual. Los porcentajes seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes por prueba de Tukey-Kramer ($P < 0.05$).

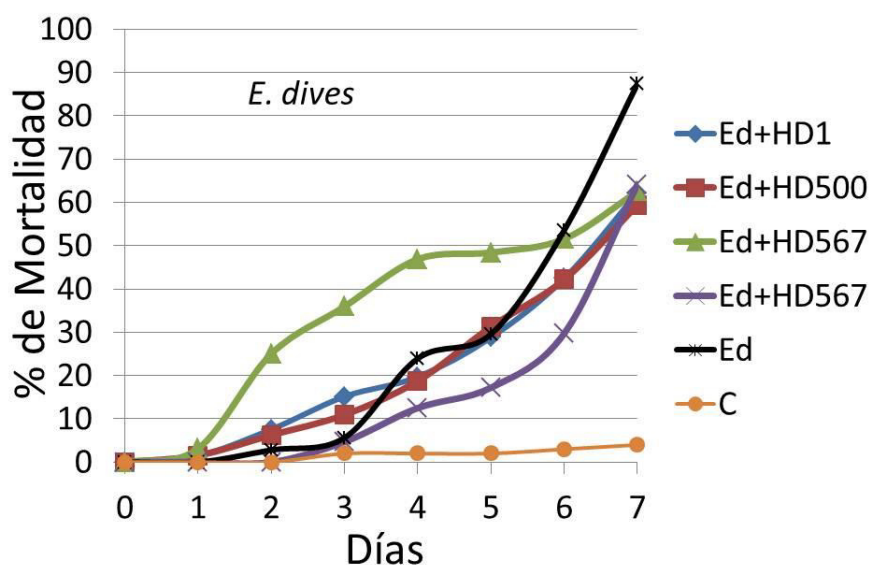


Figura 14. Dinámica del efecto combinado de la CL50 del AE de Eucalipto (*Eucaliptus dives*; Ed) y proteínas Cry parasporales provenientes de cuatro cepas de referencia, con su respectivo control negativo (C).

Tabla 20. Evaluación del efecto combinado de la CL50 del AE de *E. staigeriana* y proteínas Cry parasporales provenientes de cuatro cepas de referencia

Toxicidad por Ingestión - Mortalidad % \pm DE					
Día	AE+HD1	AE+HD500	AE+HD567	AE+HD199	AEi*
3	34.3 \pm 1.2a	22.1 \pm 2.6a	43.5 \pm 3.6a	27.4 \pm 1.5a	40.9 \pm 3.6a
4	65.7 \pm 1.5a	42.6 \pm 2.1a	59.7 \pm 2.5a	38.7 \pm 2.6a	57.6 \pm 4.0a
5	73.1 \pm 2.1ab	61.8 \pm 1.7ab	67.7 \pm 2.6ab	50.0 \pm 2.9b	78.8 \pm 3.2a
6	82.1 \pm 2.3a	75.0 \pm 2.0a	79.0 \pm 2.1a	74.2 \pm 2.1a	90.9 \pm 1.7a
7	88.1 \pm 2.1a	85.3 \pm 2.5a	83.9 \pm 3.1a	88.7 \pm 1.5a	93.9 \pm 1.5a

*AEi: Aceite esencial individual. Los porcentajes seguidos por letras diferentes son significativamente diferentes por prueba de Tukey-Kramer ($P < 0.05$).

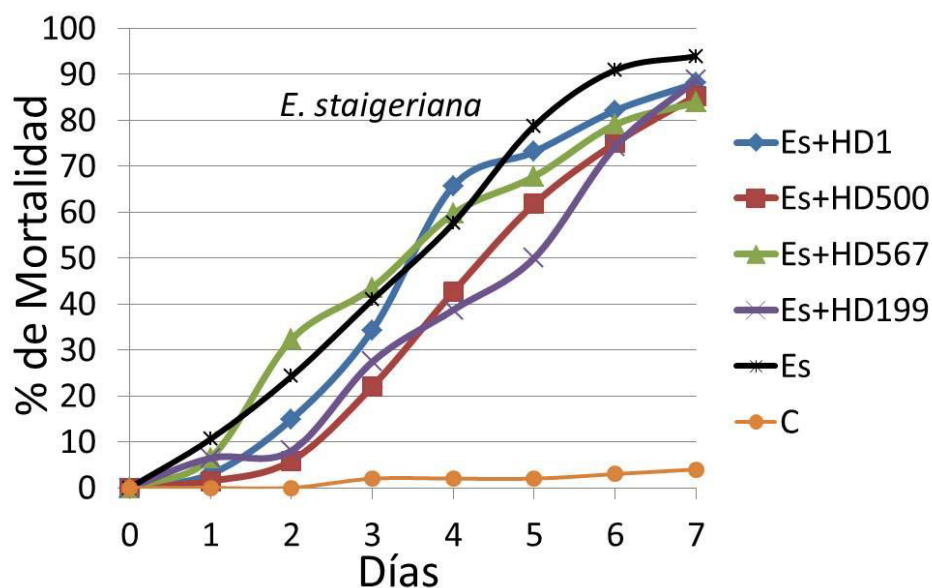


Figura 15. Dinámica del efecto combinado de la CL50 del AE de Eucalipto (*Eucaliptus staigeriana*; Es) y proteínas Cry parasporales provenientes de cuatro cepas de referencia, con su respectivo control negativo (C).

Tabla 21. Datos de la interacción de *Bacillus thuringiensis* cepas de referencia: HD1, HD500, HD567, y HD199 con los Aceites Esenciales (AE), de *Eugenia caryophyllata* (Ec), *Thymus vulgaris* (Tv), *Ocimum basilicum* (Ob), *Eucaliptus citriodora* (Eci), *Lavandula angustifolia* (La), *Eucaliptus dives* (Ed), y *Eucaliptus staigeriana* (Es), en adultos de *A. ludens*, tomado al séptimo día de bioensayo.

Tratamientos	AEi* MC% ^a	HD1 MC% ^a	TI ^b	HD500 MC% ^a	TI ^b	HD567 MC% ^a	TI ^b	HD199 MC% ^a	TI ^b
		36.67±1.5	-	18.33±0.6	-	23.33±1.5	-	38.71±1.0	-
Ec	79.4 ±3.8a	82.5 ±2.1a	EA	81.3 ±3.8a	EA	91.2 ±1.5a	SsA	81.8 ±2.6a	EA
Tv	46.0 ±2.1a	34.9 ±4.6a	E ant	35.9 ±1.5a	E ant	44.1 ±3.0a	E ant	56.1 ±4.9a	EA
Ob	50.7 ±4.5b	39.7 ±0.6b	E ant	54.0 ±4.0b	EA	83.6 ±3.0a	SA	18.0 ±0.6b	E ant
Eci	90.0 ±1.0a	78.5 ±2.6a	E ant	71.9 ±2.3a	E ant	88.7 ±4.0a	E ant	89.9 ±2.9a	E ant
La	88.4 ±2.1a	49.2 ±3.0c	E ant	57.4 ±2.6bc	E ant	85.9 ±1.5ab	E ant	61.0 ±1.7c	E ant
Ed	87.3 ±6.8a	62.1 ±1.2a	E ant	59.4 ±2.1a	E ant	62.5 ±2.1a	E ant	64.1 ±2.5a	E ant
Es	93.9 ±1.5a	88.1 ±2.1a	E ant	85.3 ±2.5a	E ant	83.9 ±3.1a	E ant	88.7 ±1.5a	E ant
Control		3.23±0.6							

*AEi Aceite Esencial individual

^aMC%: % Mortalidad Corregida ± Desviación Estándar; para este bioensayo se utilizó la CL50 de cada AE, y para las cepas *B. thuringiensis* se usó la concentración de 10 mg/ml de proteína Cry solubilizada.

^bTipo de Interacción (TI): SA: Sinergismo Adicional; SsA: Sinergismo Sub-Aditivo; EA: Efecto Aditivo; E ant.: Efecto Antagonista (Polanczyk y Alves 2005).

Los porcentajes seguidos por letras diferentes dentro de la misma fila son significativamente diferentes Tukey-Kramer (P < 0.05).

7. DISCUSIÓN

7.1 Clasificación de las cepas nativas de bacilos a partir de las muestras de suelo.

Estos índices, para muestras de suelo, se han reportado desde valores inferiores a 0.060 (Delucca *et al.* 1981, Ohba y Aratake, 1994, Ohba y Aizawa 1986, Hastowo y Lay 1992), a 0,5 (Chilcott y Wigley 1994), o incluso 0.85 cuando se utiliza la selección por acetato (Martin y Travers 1989). El índice reportado en este estudio (Buentello-Wong *et al.*, 2015) es mayor en comparación con los informes mencionados anteriormente (Delucca *et al.* 1981, Ohba y Aratake 1994, Ohba y Aizawa 1986, Hastowo y Lay 1992), lo que sugiere que *B. thuringiensis* se mantiene mejor protegido en el suelo. Una razón para esto podría ser que, cuando se recogen muestras de suelo y polvo, la superficie es siempre rechazada y el material de la muestra pertenece a una capa de suelo de al menos 5 cm debajo de la superficie, un nivel donde el daño por la luz UV no es posible y la temperatura es más estable. Todo esto viene con un precio; se podría obtener una mayor cantidad de cepas de *B. thuringiensis* pero menos diversidad en una sola muestra de suelo del campo que en una muestra de agua (Bel *et al.* 1997).

Tomamos muestras de suelo de los huertos de cítricos de la ciudad de Montemorelos, considerado el primer productor de cítricos en el noreste de México. El método de Travers (1987) es selectivo, lo que permite aislar rutinariamente de 20% a 90% de las especies de *Bacillus* de formadores de cristal entomopatógenos, tales como *Bacillus thuringiensis*.

Respecto a los porcentajes de cepas en base a la morfología de los cristales, a diferencia de los datos reportados por Vidal-Quist *et al.* (2009) quienes caracterizaron cepas de bacilos de diferentes muestras incluyeron el suelo de los huertos de cítricos en Valencia España; de un total de 896 cepas cristalíferas analizadas, encontraron que el 45% eran de morfología bipiramidal, 40% forma redonda, 7% adherido a las esporas, 5% eran pequeñas y 3% irregulares.

Se ha argumentado que las cepas de cristal bipiramidal están generalmente asociadas con la toxicidad hacia insectos lepidópteros y la presencia de la proteína Cry1. Cristales cúbicos y ovoides son activos para ambos, Lepidópteros y Dípteros, y la proteína Cry2 se relaciona con la inclusión cúbico (Glare y O'Callaghan 2000). Ibarra *et al.* (2003) mostró que las inclusiones cristalinas de tipo ovoide se caracterizan por tener actividad contra Diptera, que pertenecen a las proteínas: Cry4, Cry10 y Cry11. Esto es consistente cuando la correlación de la actividad principal de la zona, que es la cosecha de cítricos, y la principal plaga, que es la mosca Mexicana de la fruta. Informes recientes sobre la frecuencia de ocurrencia de *B. thuringiensis* aislados de ambientes naturales indican una alta posibilidad de aislar una nueva cepa. El éxito en el aislamiento de cepas productoras de cristales depende en gran medida de las técnicas empleadas. El método selectivo de acetato de sodio en combinación con el tratamiento térmico y tinción de los cristales mostró ser altamente sensible en comparación con otras técnicas, tales como la técnica de enriquecimiento, ya que tiene un límite inferior de detección de aproximadamente 10^3 bacterias por gramo de suelo. La detección e identificación de genes *cry* conocidos y nuevos a partir de un gran número de cepas aisladas es una tarea ardua. Muchos investigadores han utilizado una amplia variedad de técnicas para identificar y caracterizar los genes *cry* de *B. thuringiensis*, recientemente, muchos investigadores han recurrido a la PCR o una combinación de esta técnica con otros métodos, tales como la serología, la actividad insecticida y SDS-PAGE, para la detección y caracterización de genes *cry* de sus aislamientos.

7.2 Caracterización molecular de las cepas aisladas mediante PCR.

Ahora se utiliza la homología entre secuencias de ADN como un procedimiento para la confirmación de genes *cry* novedosos. Se requiere que los genes *cry* nuevos tengan una similitud significativa de la secuencia con una o más toxinas dentro de la nomenclatura, o ser una proteína de *B. thuringiensis* de inclusión parasporal que presente actividad plaguicida o algún efecto tóxico experimentalmente verificable a un organismo diana para asignarle un nuevo nombre.

Nuestros resultados están de acuerdo con los encontrados por Vidal-Quist *et al.* (2009) quien reportó 6.6% de los aislados de genes *cry10*, y nosotros encontramos un 3.4% para *cry10*, sin embargo en este estudio sólo hubo aislados de muestras de suelo.

7.3 Bioensayos con cepas nativas y de referencia de *Bacillus thuringiensis*

Evalúamos la toxicidad de 8 cepas de *Bacillus thuringiensis* aisladas de suelo en adultos de la mosca Mexicana de la fruta. Las larvas de *A. ludens* se desarrollan enteramente dentro de la fruta y por lo tanto, aerosoles aplicados sobre la superficie no serían eficaces para el control de fases larvarias. Por otra parte, se ha reportado que la susceptibilidad a *B. thuringiensis* de las etapas larvales de los Tefrítidos parece ser mayor que en los adultos (Karamanlidou *et al.* 1991). Sin embargo, incluso si hubiéramos encontrado cepas activas contra larvas de *A. ludens*, esto no significa necesariamente que estas cepas también son activas contra las moscas adultas, como se ha demostrado en reportes anteriores (Alberola *et al.* 1999, Robacker *et al.* 1996).

Las tasas de mortalidad corregidas en nuestro estudio oscilaron entre 5% a 28% (Fig. 7), aunque estos resultados de mortalidad se consideran relativamente bajos, resultados similares fueron obtenidos por Vidal-Quist *et al.* (2009). Ellos evaluaron 376 cepas contra la mosca del Mediterráneo (*C. capitata*) y la mortalidad máxima registrada fue de 30% por el 5.9% de sus cepas usaron suspensiones de esporas de cristal. A pesar de la complejidad de trabajar con los adultos de la mosca Mexicana de la fruta, hemos desarrollado una forma nueva de bioensayar a los adultos, el cual representa uno de los pocos estudios de toxicidad de cepas nativas de Bt en adultos de *A. ludens* (Robacker *et al.* 1996, Martínez *et al.* 1997).

La actividad biológica de cepas de Bt ha sido estudiada por muchos autores, quienes determinaron el potencial insecticida de las toxinas obtenidas: esporas y cristales. Gingrich *et al.* (1987) probaron 94 cepas de Bt y 15 de ellas mataron al menos 80% de los adultos de *C. capitata* que alimentaron con precipitados durante 9 días.

Robacker *et al.* (1996) evaluaron la acción de 55 cepas de Bt en las larvas de la mosca Mexicana de la fruta, sólo encontraron 7 cepas tóxicas en adultos; los precipitados de centrifugación o precipitados de cepas de Bt mataron más del 50% de las larvas. Las tasas de mortalidad variaron entre 4 y 62% después de la aplicación de los precipitados de estas cepas contra las moscas adultas. Sólo 5 cepas mataron 65-80% de los adultos en 10 días usaron una concentración de los precipitados de lactosa-acetona de 100 mg/ml. Nosotros obtuvimos valores de mortalidad comparables (60-75%), a una menor concentración de proteína Cry (30 mg/ml) solubilizada utilizaron las mismas cepas de referencia: HD1, HD199, HD500 y HD567, esto no significa necesariamente que las cepas son más tóxicas, sino que las proteínas provenientes de la solubilización están más concentradas que las que provienen de la precipitación por lactosa y acetona, ya que estas últimas presentan por lo general restos de componentes del medio de crecimiento (desechos) y cierta proporción de lactosa presente.

Alberola *et al.* (1999) estudiaron la actividad de Bt contra larvas del segundo estadio de *B. oleae* y adultos jóvenes. Estos autores han reportado que la mezcla de esporas-cristales (10^9 /ml) causó 70% de mortalidad de las larvas en 72 horas y 80% de la mortalidad de las moscas adultas en 6 a 10 días de aplicación.

Molina *et al.* (2010) probaron cultivos esporulados de 115 cepas bacterianas de *Bacillus pumilus* (MSH) (4.65×10^8 a 1.45×10^7 UFC / ml) contra adultos y larvas neonatas de *C. capitata*. Ninguna de estas cepas causó una mortalidad significativa de *C. capitata* adultos en comparación con los controles negativos. Las tasas de mortalidad con las 115 cepas bacterianas al final del experimento variaron de 0% a 40%, mientras que las tasas de mortalidad promedio con los controles negativos variaron de 5% a 30%. Se obtuvieron resultados similares en los bioensayos con larvas; las tasas de mortalidad corregida con los 115 aislados bacterianos variaron de 0% a 36%, mientras que las tasas de mortalidad promedio con los controles negativos variaron de 1% a 12% después de 15 días, al final del experimento. Después de este cribado, obtuvieron una nueva cepa *Bacillus pumilus*, que es altamente tóxica para las larvas de *C. capitata*. La tasa de

mortalidad de larvas de *C. capitata* osciló entre 68% a 94%, dependió de las condiciones en que se mantuvo el cultivo antes del bioensayo.

Karamanlidou *et al.* (1991) reportaron una mortalidad de más del 80%, utilizaron diversas cepas de Bt contra larvas del díptero mosca del olivo, *B. oleae*.

Benyelles y Gaouar (2008) han probado el efecto de Bti en larvas del tercer estadio y en adultos de *C. capitata* aisladas de huertos de cítricos en Argelia, se observó toxicidad en dosis altas (100 mg/g) con una reducción de la emergencia de adultos (84.62%), llegaron a la conclusión de que la etapa larvaria 3 y los adultos son muy susceptibles a esta dosis del producto Bti.

7.4 Toxicidad de los Aceites esenciales

Este estudio es el primero en reportar la toxicidad de estos aceites esenciales en *A. ludens* (Buentello-Wong *et al.*, 2016); Esto también aumenta el número de AEs para utilizar en formulaciones contra las moscas de la familia Tephritidae. *Eugenia caryophyllus* fue el AE más tóxico contra moscas adultas con una CL50 de 0.35% (3529 ppm) y CL90 de 0.78% (7763 ppm; Tabla 11). Esto puede ser debido a la presencia de eugenol como el componente principal (77.58%). Para probar esta hipótesis se realizó un bioensayo con eugenol de 99% de pureza (Sigma-Aldrich Chemical Co., Steinheim, Alemania) y se determinó que la CL50 de eugenol puro (1757 ppm, IC del 95%: 1469 - 2101 ppm) es dos veces más tóxico que el aceite esencial. Este componente ha sido reconocido como tóxico para otros dípteros (Barbosa *et al.*, 2012; Khanikor y Bora, 2014). El eugenol actúa a través del sistema de octopaminérgico por activación de los receptores de octopamina, que es un neuromodulador en los artrópodos y puede tener influencias neurohormonales (Enán EE 2005b). Otros estudios sobre células cultivadas de *Periplaneta americana* L. y cerebros de *Drosophila melanogaster* (Meigen) demostraron que el eugenol imita la acción de octopamina y aumenta los niveles de calcio intracelular (Enán EE 2005a).

T. vulgaris fue el segundo aceite más tóxico para los adultos de *A. ludens* con una CL50 de 0.53% (5347 ppm; Tabla 11), otros autores han informado de la toxicidad del aceite esencial con larvas de otros dípteros (Knio *et al.*, 2008; Tchoumboungang *et al.*, 2009; Pavela 2009). No se encontró ningún informe de la utilización del AE de *T. vulgaris* o cualquier otro AE en los adultos de *A. ludens* y no fue posible hacer una comparación adecuada ni de toxicidad que se indica en este estudio ni su correlación en base a los componentes del AE. Suponemos que los componentes que tienen la actividad tóxica son: timol (36.85%), α -terpineol (12.58%), y linalol (16.65%), quizá en forma sinérgica, los cuales se presentan en mayor proporción. El timol se une a los receptores de GABA asociados con los canales de cloro situados en la membrana de las neuronas postsinápticas e interrumpe el funcionamiento de las sinapsis mediada por GABA (Priestley *et al.*, 2003). Papachristos *et al.* (2009) señaló la toxicidad de algunos componentes que son predominantes en el AE de *T. vulgaris* y *O. basilicum* (linalol, α -terpineol, 4-terpineol y neral) frente a larvas de *Ceratitis capitata* (Wiedemann); estos monoterpenos oxigenados fueron los más tóxicos de 17 monoterpenos y sesquiterpenos probados contra larvas de *C. capitata*, con una CL50 inferior a 5 μ l/g de alimento.

Por último, en relación con el aceite esencial de *O. basilicum*, que presentó una concentración letal media de 0.81% (8050 ppm; Tabla 11) otros autores han informado de la toxicidad de este aceite esencial en bioensayos con larvas de dípteros (Amer y Mehlhorn 2006; Kalaivani *et al.*, 2012; Govindarajan *et al.*, 2013). Suponemos que el componente bioactivo es el Estragol (72.64%), esta molécula ha sido reportada como altamente tóxica para otras moscas de la fruta, Chang *et al.* (2009) probaron el aceite de albahaca y sus tres principales componentes activos (trans-anetol, estragol y linalol) en tres especies de tefrítidos: *Ceratitis capitata*, *Bactrocera dorsalis*, y *Bactrocera cucurbitae* para probar la actividad insecticida. Los tres productos químicos ensayados y el aceite de albahaca a una concentración de 2.5% o superior, con excepción de linalol, produjeron una mortalidad de >77% en todas las especies de moscas de la fruta después de 2-h de exposición. En general, trans-anetol y estragol resultaron más potentes que el aceite esencial de albahaca o linalol. Aunque las dosis letales que se presentan en el trabajo actual parecen ser altas o tener baja eficiencia, otros autores han reportado

valores de toxicidad por ingestión de AEs similares o incluso superiores en otras moscas de la fruta, Canale *et al.* (2013) llevaron a cabo un ensayo por ingestión con los AEs de *Hyptis suaveolens* L., *Rosmarinus officinalis* L. y *Lavandula angustifolia* (Miller) en *Bactrocera oleae* ellos informaron valores de CL50 ppm (95% IC) de 4922 (4077-5776), 5107 (4100-6110) y, 6271 (5346- 7232) respectivamente. Benelli *et al.* (2012) reportaron valores de toxicidad CL50 ppm (95% IC) para *C. capitata* con las AEs anteriores y además incluyeron el de *Thuja occidentalis*, con grandes variaciones en los valores de toxicidad, *H. suaveolens* 13041 (11317 - 15046), *R. officinalis* 3664 (132-5990), *L. angustifolia* 6860 (5608- 8100) y, *T. occidentalis* 5371 (3979- 6760), ellos también realizaron bioensayos de toxicidad por contacto y de fumigación de estos AEs en la mosca del mediterráneo indicaron dosis menores con respecto a los ensayos de ingestión.

7.5 Análisis de los componentes de 3 Aceites Esenciales

El AE de *E. caryophyllus* reportado en este proyecto conserva la proporción de los principales constituyentes junto con otros reportados (Fichi *et al.*, 2007) con ligeras variaciones en los porcentajes de eugenol (77.58%) y β -cariofileno (6.22%). Otros autores han informado de la caracterización del AE de *T. vulgaris* (Knio *et al.*, 2008; Tchoumboungang *et al.*, 2009; Pavela 2009) y todos ellos indican al timol como componente principal. Respecto a los componentes principales de *O. basilicum*, en comparación con los reportados por Martínez-Velázquez *et al.* (2011), muestran relativamente la misma proporción, las cuales fueron linalol y estragol las principales moléculas, pero con algunas variaciones en los porcentajes, lo que sugiere que la composición química de la albahaca y el aceite esencial de tomillo está fuertemente afectada por el quimiotipo de las plantas. La variación en la composición química también se ha informado entre los aceites esenciales obtenidos a partir de diferentes variedades o partes de una sola planta (Moreno *et al.*, 2007). Además, numerosos otros factores también pueden afectar a la composición de los aceites esenciales. Origen geográfico (Raal *et al.*, 2007), la estacionalidad (Flamini y Cioni 2007), el método de

extracción del aceite (Chiasson *et al.*, 2001), año de cosecha (Chalchat *et al.*, 2007) e incluso las condiciones de almacenamiento (Chalchat *et al.*, 2007), son todos factores que han sido reportados para influir en la química del aceite esencial. Para evitar dicha variabilidad, la composición de EO podría mantenerse dentro del rango requerido por la selección de las plantas deseadas mediante propagación vegetativa (por ejemplo, esquejes) bajo condiciones controladas. Además, un control periódico de la composición de la EO debe ayudar en la obtención de una composición más constante.

7.6 Comparación de la actividad bioinsecticida del conjunto cristales parasporales y los aceites esenciales botánicos en la mosca Mexicana de la fruta.

Muchas veces el efecto letal no es el objetivo primario para el control de plagas, debido a que este requiere de altas dosis y, por lo tanto, una gran cantidad de materia prima. Una manera de incrementar la efectividad de un compuesto natural es su uso en conjunción con un insecticida químico o cualquier otro bioplaguicida, como puede ser *B. thuringiensis*, esta interacción se basa en el principio que uno de los dos agentes insecticida actúa como un estresor, haciéndolo más susceptible a la acción del otro agente, ya sea *B. thuringiensis* o algún metabolito en el aceite esencial de alguna planta. La compatibilidad con otros insecticidas biológicos o agentes de biocontrol es importante para desarrollar estrategias que utilicen entomopatógenos en los programas de manejo integrado de plagas (Gardner *et al.*, 1984). En este caso, es esencial investigar las potenciales interacciones, principalmente para hacer viable su uso en términos económicos y también para determinar su impacto ambiental (Polanczyk y Alves 2005).

Knaak *et al.*, (2010) evaluaron el efecto de la interacción de varios extractos de plantas con el producto comercial Xentari® (*Bacillus thuringiensis* var. *aizawai*) en el intestino medio de *Spodoptera frugiperda*, demostraron que los efectos patológicos de *Zingiber officinale*, *Malus sylvestris*, *Ruta graveolens* y *Baccharis genistelloides* fueron más intensos cuando se compararon con extractos de *Petiveria alliacea* y *Cymbopogon citratus*, los cuales mostraron una interacción positiva con el producto comercial Xentari®, acelerando el proceso de destrucción de las células intestinales, lo cual

representó una disminución en el tiempo de letalidad en *S. frugiperda*. Mahesh Kumar *et al.* (2012), evaluaron la bio-eficacia del extracto de *Solanum xanthocarpum* y *B. thuringiensis*, en contra de larvas de primer hasta cuarto instar de *Culex quinquefasciatus*, los tratamientos combinados de *S. xanthocarpum* x *B. thuringiensis* (1:2) demostraron una mayor actividad larvicida y pupicida que los tratamientos individuales, al disminuir notablemente la CL50 de los tratamientos combinados determinaron que existe una clara evidencia de sinergismo entre los dos agentes.

En el presente estudio de interacción entre las cepas de referencia entomopatógenas de *B. thuringiensis* y los aceites esenciales, encontramos que la mayoría fueron antagonistas, excepto para el AE de *E. caryophyllata* x HD1, HD500, HD567 y HD199, los cuales presentaron efectos aditivos y una interacción de tipo sub-aditiva con la cepa HD567; *T. vulgaris* x HD199, que presentó un efecto aditivo; y *O. basilicum* x HD500 y HD567, de tal forma que la última combinación (*O. basilicum* x HD567), fue la única que presentó una interacción de sinergismo adicional (Tabla 21). La inhibición de la acción de *B. thuringiensis* puede ser debido a la disminución en la ingesta del tratamiento, o por la competencia entre el aceite esencial y el microorganismo en el huésped (Glare y O'Callaghan 2000). Este tipo de efecto es común cuando interactúan agentes de distinta naturaleza (Benz 1971).

El antagonismo, de acuerdo con (Polanczyk y Alves 2005), puede tener varias causas, como: (i) las pequeñas dosis de un insecticida pueden tener efectos repelentes o puede disminuir la actividad del insecto, en consecuencia el insecto no entra en contacto con las dosis letales del plaguicida o patógeno; (ii) el patógeno puede tener la habilidad de degradar metabólicamente la molécula plaguicida, para prevenir o disminuir su acción en el insecto; (iii) el uso de dosis sub-letales de insecticida pueden producir un incremento en la tasa metabólica y por consecuencia un incremento en la respuesta inmune contra el patógeno. *B. thuringiensis* actúa por medio de la ingestión y tiene inicialmente restringida su acción al tracto digestivo del insecto. Sin embargo, a través del mecanismo desencadenado por las toxinas Cry, se desarrolla una sepsis por las toxinas y enzimas distribuidas por el cuerpo del insecto (Glare y O'Callaghan 2000; Fiuza 2009). En este punto, ocurre una competencia con los compuestos secundarios

presentes en el aceite esencial. De acuerdo con Novan (1992), el uso de extractos de plantas reduce la alimentación en insectos debido a la presencia de aleloquímicos, los cuales optimizan la actividad insecticida del organismo, resultando en una elevada tasa de mortalidad. De tal manera, los extractos de plantas apropiadamente seleccionados y en concentraciones óptimas, pueden ser usados en combinación con entomopatógenos para obtener efectos aditivos o sinérgicos en el control de plagas (Saito y Lucchini 1998).

8. CONCLUSIONES

1. De 202 cepas aisladas de muestras de suelo, siete fueron caracterizadas mediante PCR, la mayor mortalidad presentada fue de 30%, cepa IB-00107, la cual presentó el gen *cry10*.
2. Se determinó la toxicidad de 4 cepas de referencia de *B. thuringiensis*: HD1, HD199, HD500 y HD567, las cuales presentaron 67, 75, 35, y 60% de mortalidad respectivamente con proteínas Cry solubilizadas.
3. Siete de los diez aceites esenciales de plantas utilizados en este estudio, muestran toxicidad en adultos de *A. ludens*, los cuales presentan una mortalidad proporcional a la concentración ingerida.
4. En orden de mayor a menor toxicidad: *E. caryophyllus*, *T. vulgaris*, *O. basilicum*, *E. citriodora*, *L. angustifolia*, *E. dives*, y *E. staigeriana*, con una CL50 (% p/v) de: 0.35, 0.53, 0.81, 1.26, 1.68, 2.20, y 3.22 respectivamente.
5. La composición química de los tres AEs más tóxicos fue investigada por CG-EM, donde se contabilizó del 96-97% de la totalidad de los componentes, los cuales fueron: Eugenol, Timol, y Estragol, los metabolitos primarios de: *E. caryophyllus*, *T. vulgaris*, y *O. basilicum*, respectivamente.
6. La alta toxicidad del AE de *E. caryophyllus* se debe al eugenol, este componente presenta por sí mismo una CL50 (0.17% p/v) dos veces más tóxica que el AE.
7. Solo el AE de *O. basilicum* y las proteínas Cry provenientes de la cepa HD567, al administrarse de manera conjunta presentan una interacción de sinergismo adicional. Para los demás AEs probados en este estudio, no existe diferencia significativa en la mortalidad si se administran de manera conjunta las proteínas Cry y los AEs.

LITERATURA CITADA

- Abbott, W.S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18, 265-267.
- Aboussaid, H., Aouame, L., Messoussi, S., Oufdou, K., 2010. Biological Activity of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) Strains on Larvae and Adults of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Journal of Environmental Protection* 1, 337-345.
- Agaisse, H., Lereclus, D., 1995. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *Journal of Bacteriology* 177, 6027-6032.
- Ahmed, I., Yokota, A., Yamazoe, A., Fujiwara, T., 2007. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 1117-1125.
- Alberola, T.M., Aptosoglou, S., Arsenakis, M., Bel, Y., Delrio, G., Ellar, D.J., Ferre, J., Granero, F., Guttman, D.M., Koliais, S., Martinez-Sebastian, M.J., Prota, R., Rubino, S., Satta, A., Scarpellini, G., Sivropoulou, A., Vasara, E., 1999. Insecticidal activity of strains of *Bacillus thuringiensis* on larvae and adults of *Bactrocera oleae* Gmelin (Dipt. Tephritidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 74, 127-136.
- Albrecht, C.P., Sherman, M., 1987. Lethal and sublethal effects of Avermectin B1 on three fruit fly species. *Journal of Economic Entomology* 80:344-347.
- Aluja, M., 1993. Manejo integrado de la mosca de la fruta. Editorial Trillas. 241 p., México.
- Aluja, M., 1994. Bionomics and Management of *Anastrepha*. *Annual Review of Entomology* 39, 155-178.
- Aluja, M., Birke, A., 1993. Habitat Use by Adults of *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) in a Mixed Mango and Tropical Plum Orchard. *Annals of the Entomological Society of America* 86, 799-812.
- Aluja, M., Celedonio-Hurtado, H., Liedo, P., Cabrera, M., Castillo, F., Guillén, J., Rios, E., 1996. Seasonal Population Fluctuations and Ecological Implications for Management of *Anastrepha* Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) in Commercial Mango Orchards in Southern Mexico. *Journal of Economic Entomology* 89, 654-667.
- Aluja, M., Guillen, J., Liedo, P., Cabrera, M., Rios, E., De la Rosa, G., Celedonio, H., Mota, D., 1990. Fruit infesting tephritids [Dipt.: Tephritidae] and associated parasitoids in Chiapas, Mexico. *Entomophaga* 35, 39-48.

Aluja, M., Jiménez, A., Camino, M., Piñero, J., Aldana, L., Castrejón, V., Elena Valdés, M., 1997a. Habitat Manipulation to Reduce Papaya Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) Damage: Orchard Design, Use of Trap Crops and Border Trapping. *Journal of Economic Entomology* 90, 1567-1576.

Aluja, M., Jiménez, A., Piñero, J., Camino, M., Aldana, L., Valdés, M.E., Castrejón, V., Jácome, I., Dávila, A.B., Figueroa, R., 1997b. Daily Activity Patterns and within-Field Distribution of Papaya Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) in Morelos and Veracruz, Mexico. *Annals of the Entomological Society of America* 90, 505-520.

Aluja, M., Liedo, P., 1986. Future perspectives on integrated management of fruit flies in Mexico. *Pest Control: Operations and Systems Analysis in Fruit Fly Management*. Springer, Berlin, 12-48.

Aluja, M., López, M., Sivinski, J., 1998. Ecological Evidence for Diapause in Four Native and One Exotic Species of Larval-Pupal Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) Parasitoids Tropical Environments. *Annals of the Entomological Society of America* 91, 821-833.

Amer, A., Mehlhorn, H., 2006. Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae). *Parasitology Research* 99, 466-472.

Bajwa, W.I., Kogan, M., 2001. *Bacillus thuringiensis*-Based Biological Control of Insect Pests. Integrated Plant Protection Center (IPPC), Oregon State University, Corvallis.

Baker, A.C., Stone, W.E., Plummer, C.C., McPhail, M., 1944. A review of studies on the Mexican fruit fly and related species. Miscellaneous Publication 531. USDA.155 pp.

Baranowski, R., Glenn, H., Sivinski, J., 1993. Biological control of the Caribbean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*, 245-251.

Barbosa, J.D., Silva, V.B., Alves, P.B., Gumina, G., Santos, R.L., Sousa, D.P., Cavalcanti, S.C., 2012. Structure-activity relationships of eugenol derivatives against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Pest Management Science* 68, 1478-1483.

Barloy, F., Delécluse, A., Nicolas, L., Lecadet, M.M., 1996. Cloning and expression of the first anaerobic toxin gene from *Clostridium bifermentans* subsp. malaysia, encoding a new mosquitocidal protein with homologies to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Journal of Bacteriology* 178, 3099-3105.

Basset, A., Khush, R.S., Braun, A., Gardan, L., Boccard, F., Hoffmann, J.A., Lemaitre, B., 2000. The phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* infects *Drosophila* and activates an immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 3376-3381.

Bateman, M.A., 1972. The Ecology of Fruit Flies. *Annual Review of Entomology* 17, 493-518.

- Batra, S.W., 1982. Biological control in agroecosystems. *Science* 215, 134-139.
- Bauce E., Carisey N., Dupont A., van Frankenhuyzen K. 2004. *Bacillus thuringiensis* subsp *kustaki* aerial spray prescriptions for balsam fir stand protection against spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). *J Econ Entomol*; 97:1624–1634.
- Becker, N. 2000. Bacterial control of vector-mosquitoes and black flies. In: Charles, JF.; Delécluse, A.; NielsenLeRoux, C., editors. *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application*. Kluwer Academic Publishers; p. 383
- Bel, Y., Granero, F., Alberola, T.M., Martinez-Sebastian, M.J., Ferre, J., 1997. Distribution, frequency and diversity of *Bacillus thuringiensis* in olive tree environments in Spain. *Systematic and Applied Microbiology* 20, 652-658.
- Benelli, G., Flamini, G., Canale, A., Cioni, P.L., Conti, B., 2012. Toxicity of some essential oil formulations against the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera Tephritidae). *Crop Protection* 42, 223-229.
- Benz G. 1971. Synergism of microorganisms and chemical insecticides. In Burges, HD; HUSSEY, NW. (Ed.) *Microbial control of insects and mites*. Londres: Academic Press, cap. 14, p.327-356.
- Berliner, E., 1915. Über die Schlaffsucht der Mehlmotenraupe (*Ephestia kühniella* Zell.) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis* n. sp. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* 2, 29-56.
- Beroza, M., Alexander, B.H., Steiner, L.F., Mitchell, W.C., Myyashita, D.H., 1960. New synthetic Jures for the mate melon fly. *Science* 131, 1044-1045.
- Bischof, L.J., Enan, E.E., 2004. Cloning, expression and functional analysis of an octopamine receptor from *Periplaneta americana*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34, 511-521.
- Bode, H.B., 2009. Entomopathogenic bacteria as a source of secondary metabolites. *Current Opinion in Chemical Biology* 13, 224-230.
- Boller, E.F., Prokopy, R.J., 1976. Bionomics and Management of *Rhagoletis*. *Annual Review of Entomology* 21, 223-246.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Bravo, A., 1997. Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin family proteins and their functional domains. *Journal of Bacteriology* 179, 2793-2801.

Bravo, A., Gomez, I., Conde, J., Munoz-Garay, C., Sanchez, J., Miranda, R., Zhuang, M., Gill, S.S., Soberon, M., 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochimica et Biophysica Acta* 1667, 38-46.

Bravo, A., Hendrickx, K., Jansens, S., Peferoen, M., 1992. Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. *Journal of Invertebrate Pathology* 60, 247-253.

Bresolin, G., Morgan, J.A., Ilgen, D., Scherer, S., Fuchs, T.M., 2006. Low temperature-induced insecticidal activity of *Yersinia enterocolitica*. *Molecular Microbiology* 59, 503-512.

Broderick, N.A., Raffa, K.F., Handelsman, J., 2006. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 15196-15199.

Brown, K.L., Whiteley, H.R., 1990. Isolation of the second *Bacillus thuringiensis* RNA polymerase that transcribes from a crystal protein gene promoter. *Journal of Bacteriology* 172, 6682-6688.

Buentello-Wong, S., Galán-Wong, L., Arévalo-Niño, K., Almaguer-Cantú, V., Rojas-Verde, G., 2015. Characterization of Cry Proteins in Native Strains of *Bacillus thuringiensis* and Activity Against *Anastrepha ludens*. *Southwestern Entomologist* 40, 15-24.

Buentello-Wong, S., Galán-Wong, L., Arévalo-Niño, K., Almaguer-Cantú, V., Rojas-Verde, G., 2016. Toxicity of some essential oil formulations against the Mexican fruit fly *Anastrepha ludens* (Loew) (Diptera: Tephritidae). *Industrial Crops and Products* 85, 58-62.

Burk, T., Calkins, C.O., 1983. Medfly Mating Behavior and Control Strategies. *The Florida Entomologist* 66, 3-18.

Burns, R.E., Diaz, J.D., Holler, T.C., 1996. Inundative release of the parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* for the control of the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*. En B. A. McPherson y G. F. Steck (Eds). *Fruit Fly Pests* (pp. 377-381). Delray Beach, Florida: St. Lucie Press.

Buss, E.A., Park-Brown, S.G., 2002. Natural products for insect pest management. UF/IFAS Publication ENY-350. URL: <http://edis.ifas.ufl.edu/IN197>.

Cabrera, M.H., Ortega, D.A., 1992. Distribución de las especies de *Anastrepha* en mango en México. pp 355. En: *Memorias del XXVII Congreso Nacional de Entomología*. Sociedad Mexicana de Entomología. San Luis Potosí, México.

Caltagirone, L.E., 1981. Landmark Examples in Classical Biological Control. *Annual Review of Entomology* 26, 213-232.

Canale, A., Benelli, G., Conti, B., Lenzi, G., Flamini, G., Francini, A., Cioni, P.L., 2013. Ingestion toxicity of three Lamiaceae essential oils incorporated in protein baits against the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera Tephritidae). *Natural Product Research* 27, 2091-2099.

Carlson, C.R., Caugant, D.A., Kolstø, A.B., 1994. Genotypic Diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 1719-1725.

Carozzi, N.B., Kramer, V.C., Warren, G.W., Evola, S., Koziel, M.G., 1991. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 3057-3061.

Cornelius, M.L., Grace, K.J., Yates, J.R., 1997. Toxicity of Monoterpenoids and Other Natural Products to the *Formosan Subterranean* Termite (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Economic Entomology* 90, 320-325.

Crickmore, N., 2005. Using worms to better understand how *Bacillus thuringiensis* kills insects. *Trends in Microbiology* 13, 347-350.

Crickmore, N., Baum, J., Bravo, A., Lereclus, D., Narva, K., Sampson, K., Schnepf, E., Sun, M. and Zeigler, D.R. "Bacillus thuringiensis toxin nomenclature". 2016.
<http://www.btnomenclature.info/>

Chalchat, J.C., Ozcan, M.M., Dagdelen, A., Akgul, A., 2007. Variability of essential oil composition of *Echinophora tenuifolia* subsp. *Sibthorpiana* tutin by harvest location and year and oil storage. *Chemistry of Natural Compounds* 43, 225-227.

Chang, C.L., Cho, I.K., Li, Q.X., 2009. Insecticidal activity of basil oil, trans-anethole, estragole, and linalool to adult fruit flies of *Ceratitis capitata*, *Bactrocera dorsalis*, and *Bactrocera cucurbitae*. *Journal of Economic Entomology* 102, 203-209.

Chang, K.S., Ahn, Y.J., 2002. Fumigant activity of (E)-anethole identified in *Illicium verum* fruit against *Blattella germanica*. *Pest Management Science* 58, 161-166.

Chang, S.T., Cheng, S.S., 2002. Antitermitic activity of leaf essential oils and components from *Cinnamomum osmophleum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 1389-1392.

Charles, J.F., Nielsen-LeRoux, C., 2000. Mosquitocidal bacterial toxins: diversity, mode of action and resistance phenomena. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 95 Suppl 1, 201-206.

- Chauhan, K.R., Raina, A.K., 2006. Effect of catnip oil and its major components on the formosan subterranean termite *Coptotermes formosanus*. *Biopesticides International* 2, 137-143.
- Cheng, H.R., Jiang, N., 2006. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnology Letters* 28, 55-59.
- Chiasson, H., Belanger, A., Bostanian, N., Vincent, C., Poliquin, A., 2001. Acaricidal properties of *Artemisia absinthium* and *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) essential oils obtained by three methods of extraction. *Journal of Economic Entomology* 94, 167-171.
- Chilcott, C.N., Wigley, P.J., 1994. Opportunities for Finding New *Bacillus thuringiensis* Strains. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 49, 51-57.
- Choi, W.-S., Park, B.-S., Lee, Y.-H., Jang, D.Y., Yoon, H.Y., Lee, S.-E., 2006. Fumigant toxicities of essential oils and monoterpenes against *Lycoriella mali* adults. *Crop Protection* 25, 398-401.
- Choma, C.T., Kaplan, H., 1992. *Bacillus thuringiensis* crystal protein: effect of chemical modification of the cysteine and lysine residues. *Journal of Invertebrate Pathology* 59, 75-80.
- Christenson, L.D., Foote, R.H., 1960. Biology of Fruit Flies. *Annual Review of Entomology* 5, 171-192.
- Davies, N.W., 1990. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicon and Carbowax 20M phases. *Journal of Chromatography A* 503, 1-24.
- de Barjac, H., Bonnefoi, A., 1968. A classification of strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner with a key to their differentiation. *Journal of Invertebrate Pathology* 11, 335-347.
- de Maagd, R.A., Bravo, A., Berry, C., Crickmore, N., Schnepf, H.E., 2003. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annual Review of Genetics* 37, 409-433.
- de Maagd, R.A., Bravo, A., Crickmore, N., 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics: TIG* 17, 193-199.
- Delucca, A.J., Simonson, J.G., Larson, A.D., 1981. *Bacillus thuringiensis* Distribution in Soils of the United-States. *Canadian Journal of Microbiology* 27, 865-870.
- Dimock, M.B., Renwick, J.A.A., 1991. Oviposition by Field Populations of *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) Deterred by an Extract of a Wild Crucifer. *Environmental Entomology* 20, 802-806.

- Djerassi, C., Shih-Coleman, C., Diekman, J., 1974. Insect control of the future: operational and policy aspects. *Science* 186, 596-607.
- Don-Pedro, K.N., 1996. Investigation of single and joint fumigant insecticidal action of citruspeel oil components. *Pesticide Science* 46, 79-84.
- Dubey, A., Gupta, R., Chandel, B.S., 2004. Efficacy of *Acorus calamus*, *Vitex negundo* and *Ageratum conyzoides* against tobacco caterpillar *Spilarctia obliqua* Walker. *Indian Journal of Entomology* 66, 238.
- Dulmage, H.T., Correa, J.A., Martinez, A.J., 1970. Coprecipitation with lactose as a means of recovering the sporocyst-crystal complex of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 15, 15-20.
- Economopoulos, A.P., McPherson, B.A., Steck, G.J., 1996. Quality control and SIT field testing with genetic sexing Mediterranean fruit fly males. *Fruit Fly Pests: A World Assessment of Their Biology and Management*. St. Lucie Press, Delray Beach, FL, USA, 385-389.
- Ejiofor, A.O., Johnson, T., 2002. Physiological and molecular detection of crystalliferous *Bacillus thuringiensis* strains from habitats in the South Central United States. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 28, 284-290.
- Elliot, S.L., Sabelis, M.W., Janssen, A., Geest, L.P.S., Beerling, E.A.M., Fransen, J.J., 2000. Can plants use entomopathogens as bodyguards? *Ecology Letters* 3, 228-235.
- Enan, E.E., 2005a. Molecular and pharmacological analysis of an octopamine receptor from American cockroach and fruit fly in response to plant essential oils. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 59, 161-171.
- Enan, E.E., 2005b. Molecular response of *Drosophila melanogaster* tyramine receptor cascade to plant essential oils. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35, 309-321.
- Epsky, N.D., Heath, R.R., Sivinski, J.M., Calkins, C.O., Baranowski, R.M., Fritz, A.H., 1993. Evaluation of protein bait formulations for the Caribbean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*, 626-635.
- Feitelson, J.S., Payne, J., Kim, L., 1992. *Bacillus thuringiensis*: Insects and Beyond. *Nature Biotechnology* 10, 271-275.
- Fichi, G., Flamini, G., Giovanelli, F., Otranto, D., Perrucci, S., 2007. Efficacy of an essential oil of *Eugenia caryophyllata* against *Psoroptes cuniculi*. *Experimental Parasitology* 115, 168-172.
- Finney, D.J., 1952. *Probit Analysis*. 2nd ed. Cambridge University Press, New York, 22.5 × 14 cm. xiv + 318 pp. *Journal of the American Pharmaceutical Association* 41, 627.

- Fiuza LM. 2009. Mecanismo de ação de *Bacillus thuringiensis*. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 38: 32-35.
- Flamini, G., Cioni, P.L., 2007. Seasonal variation of the chemical constituents of the essential oil of *Santolina etrusca* from Italy. *Chemistry and Biodiversity* 4, 1008-1019.
- Forst, S., Dowds, B., Boemare, N., Stackebrandt, E., 1997. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. *Annual Review of Microbiology* 51, 47-72.
- Forst, S., Nealson, K., 1996. Molecular biology of the symbiotic-pathogenic bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. *Microbiology Reviews* 60, 21-43.
- Gardner WA, Noblet R, Schwehr R. 1984. The potential of microbial agents in managing populations of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomologist*, 67: 325-332.
- Gary, N.E., Mussen, E.C., 1984. Impact of Mediterranean Fruit Fly Malathion Bait Spray on Honey Bees. *Environmental Entomology* 13, 711-717.
- Gingrich, R.E., 1987. Demonstration of *Bacillus thuringiensis* as a Potential Control Agent for the Adult Mediterranean Fruit-Fly, *Ceratitis capitata* (Wied). *Journal of Applied Entomology* 104, 378-385.
- Gingrich, R.E., 1993. Biological Control of Tephritid Fruit Flies by Inundative Releases of Natural Enemies, in: Aluja, M., Liedo, P. (Eds.), *Fruit Flies: Biology and Management*. Springer New York, New York, NY, pp. 311-318.
- Glare, T.R., O'Callaghan, M., 2000 *Bacillus thuringiensis*: Biology, Ecology and Safety. P. 423. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Gould, W.P., Hennessey, M.K., 1997. Mortality of *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) in carambolas treated with cold water precooling and cold storage. *Florida Entomologist*, 79-84.
- Govindarajan, M., Sivakumar, R., Rajeswary, M., Yogalakshmi, K., 2013. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Ocimum basilicum* (L.) against *Culex tritaeniorhynchus*, *Aedes albopictus* and *Anopheles subpictus* (Diptera: Culicidae). *Experimental Parasitology* 134, 7-11.
- Greany, P.D., McDonald, R.E., Schroeder, W.J., Shaw, P.E., 1991. Improvement in efficacy of gibberellic acid treatments in reducing susceptibility of grapefruit to attack by Caribbean fruit fly. *Florida Entomologist*, 570-580.
- Grenier, A.M., Duport, G., Pages, S., Condemine, G., Rahbe, Y., 2006. The phytopathogen *Dickeya dadantii* (*Erwinia chrysanthemi* 3937) is a pathogen of the pea aphid. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 1956-1965.

- Grimont, P.A.D., Jackson, T.A., Ageron, E., Noonan, M.J., 1988. *Serratia entomophila* sp. nov. associated with amber disease in the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 38, 1-6.
- Gringorten, J.L., Milne, R.E., Fast, P.G., Sohi, S.S., Van Frankenhuyzen, K., 1992. Suppression of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin activity by low alkaline pH. Journal of Invertebrate Pathology 60, 47-52.
- Guillet, P., Kurstack, D.C., Philippon, B., Meyer, R. 1990. Bacterial Control of Mosquitoes and Blackflies. De Barjac, H.; Sutherland, D.J., editors. Rutgers Univ. Press; NJ: p. 187-190.
- Hajek, A., 2004. Natural enemies: an introduction to biological control. Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp 378
- Hallman, G.J., 1997. Mortality of Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) immatures in coated grapefruits. Florida Entomologist, 324-328.
- Harwood, C.R., 1989. Introduction to the biotechnology of *Bacillus*. In: *Bacillus*, Plenum Press New York, pp. 1-4
- Harwood, S.H., Moldenke, A.F., Berry, R.E., 1990. Toxicity of Peppermint Monoterpenes to the Variegated Cutworm (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Economic Entomology 83, 1761-1767.
- Hassani, F., Gaouar Benyelles, N., 2008. Application of *Bacillus thuringiensis* (Bti) Struggling Microbiological Control of the Fruit Fly *Ceratitidis capitata* (wied) (Diptera: Tephritidae). IBSCientific Journal of Science 3, 10-13.
- Hastowo, S., Lay, B.W., Ohba, M., 1992. Naturally occurring *Bacillus thuringiensis* in Indonesia. Journal of Applied Bacteriology 73, 108-113.
- Helgason, E., Caugant, D.A., Olsen, I., Kolsto, A.B., 2000. Genetic structure of population of *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* isolates associated with periodontitis and other human infections. Journal of Clinical Microbiology 38, 1615-1622.
- Hernández-Ortiz, V., 1992. El género *Anastrepha* Schiner en México (Diptera: Tephritidae). Taxonomía, distribución y sus plantas huéspedes. Instituto de Ecología Publ. 33. Xalapa, Veracruz, México. 162 pp.
- Hernández-Ortiz, V., Aluja, M., 1993. Listado de especies del género neotropical *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) con notas sobre su distribución y plantas hospederas. Folia Entomológica Mexicana 88, 89-105.
- Hierro, I., Valero, A., Perez, P., Gonzalez, P., Cabo, M.M., Montilla, M.P., Navarro, M.C., 2004. Action of different monoterpenic compounds against *Anisakis simplex* s.l.

L3 larvae. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 11, 77-82.

Höfte, H., Whiteley, H.R., 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology Reviews* 53, 242-255.

Holler, T.C., Harris, D.L., 1993. Efficacy of sterile releases of Caribbean fruit flies (Diptera: Tephritidae) against wild populations in urban hosts adjacent to commercial citrus. *Florida Entomologist*, 251-258.

Hoult, B., Tuxford, A.F., 1991. Toxin production by *Bacillus pumilus*. *Journal of Clinical Pathology* 44, 455-458.

Howarth, F.G., 1991. Environmental Impacts of Classical Biological Control. *Annual Review of Entomology* 36, 485-509.

Huang, X., Madan, A., 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research* 9, 868-877.

Huang, Y., Ho, S.H., 1998. Toxicity and antifeedant activities of cinnamaldehyde against the grain storage insects, *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. *Journal of Stored Products Research* 34, 11-17.

Hummelbrunner, L.A., Isman, M.B., 2001. Acute, sublethal, antifeedant, and synergistic effects of monoterpenoid essential oil compounds on the tobacco cutworm, *Spodoptera litura* (Lep. Noctuidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 715-720.

Ibarra, J.E., del Rincon, M.C., Orduz, S., Noriega, D., Benintende, G., Monnerat, R., Regis, L., de Oliveira, C.M.F., Lanz, H., Rodriguez, M.H., Sanchez, J., Pena, G., Bravo, A., 2003. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 5269-5274.

INEGI. (2014). INEGI. Encuesta Nacional Agropecuaria 2014. Acceso 24/05/2016, En: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/encuestas/agropecuarias/ena/ena2014/>

Ishiwata, S., 1901. On a kind of severe flacherie (sotto disease). *Dainihon Sanshi Kaiho* 114, 5.

Isman, M.B., 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection* 19, 603-608.

Isman, M.B., Wan, A.J., Passreiter, C.M., 2001. Insecticidal activity of essential oils to the tobacco cutworm, *Spodoptera litura*. *Fitoterapia* 72, 65-68.

Jackson, T.A., Pearson, J., O'callaghan, M., Mahanty, H., Willocks, M., 1992. Pathogen to product-development of *Serratia entomophila* (Enterobacteriaceae) as a commercial

biological control agent for the New Zealand grass grub (*Costelytra zealandica*). En: Jackson TA, Glare TR (eds) Use of pathogens in scarab pest management. Intercept, Andover, UK, pp 191-198.

Jennings, W., Shibamoto, T., 1980. Appendix III - Retention Indices in Increasing Order on Polyethylene Glycol Carbowax 20M, in: Shibamoto, W.J. (Ed.), Qualitative Analysis of Flavor and Fragrance Volatiles by Glass Capillary Gas Chromatography. Academic Press, pp. 86-113.

Jensen, G.B., Hansen, B.M., Eilenberg, J., Mahillon, J., 2003. The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. Environmental Microbiology 5, 631-640.

Jensen, G.B., Wilcks, A., Petersen, S.S., Damgaard, J., Baum, J.A., Andrup, L., 1995. The genetic basis of the aggregation system in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is located on the large conjugative plasmid pXO16. Journal of Bacteriology 177, 2914-2917.

Johnston, P.R., Crickmore, N., 2009. Gut bacteria are not required for the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* toward the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Applied and Environmental Microbiology 75, 5094-5099.

Joung, K.B., Cote, J.C., 2001. Phylogenetic analysis of *Bacillus thuringiensis* serovars based on 16S rRNA gene restriction fragment length polymorphisms. Journal of Applied Microbiology 90, 115-122.

Kaelin, P., Morel, P., Gadani, F., 1994. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from Stored Tobacco and *Lasioderma serricorne* (F.). Applied and Environmental Microbiology 60, 19-25.

Kalaivani, K., Senthil-Nathan, S., Murugesan, A.G., 2012. Biological activity of selected Lamiaceae and Zingiberaceae plant essential oils against the dengue vector *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). Parasitology Research 110, 1261-1268.

Karamanlidou, G., Lambropoulos, A.F., Koliais, S.I., Manousis, T., Ellar, D., Kastritsis, C., 1991. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to Laboratory Populations of the Olive Fruit-Fly (*Dacus oleae*). Applied and Environmental Microbiology 57, 2277-2282.

Karr, L.L.C., J. R., 1988. Insecticidal properties of d-limonene. Journal of Pesticide Science 13, 287-290.

Khan, Z.R., Saxena, R.C., 1986. Effect of steam distillate extracts of resistant and susceptible rice cultivars on behavior of *Sogatella furcifera* (Homoptera: Delphacidae). Journal of Economic Entomology 79, 928-935.

Khanikor, B., Bora, D., 2014. Toxicity of essential oil compounds against *Exorista sorbillans* (Diptera: Tachinidae), a parasitoid of silkworm. African Journal of Biotechnology 10, 19807-19815.

- Knaak N, Tagliari MS, Fiuza LM. 2010. Histopatologia da interação de *Bacillus thuringiensis* e extratos vegetais no intestino médio de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Arquivos do Instituto Biológico, 77(1): 83-89.
- Knio, K.M., Usta, J., Dagher, S., Zournajian, H., Kreydiyyeh, S., 2008. Larvicidal activity of essential oils extracted from commonly used herbs in Lebanon against the seaside mosquito, *Ochlerotatus caspius*. Bioresource Technology 99, 763-768.
- Knipling, E.F., 1955. Possibilities of Insect Control or Eradication Through the Use of Sexually Sterile Males. Journal of Economic Entomology 48, 459-462.
- Kordali, S., Cakir, A., Mavi, A., Kilic, H., Yildirim, A., 2005. Screening of Chemical Composition and Antifungal and Antioxidant Activities of the Essential Oils from Three Turkish Artemisia Species. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53, 1408-1416.
- Kostyukovsky, M., Rafaeli, A., Gileadi, C., Demchenko, N., Shaaya, E., 2002. Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: possible mode of action against insect pests. Pest Management Science 58, 1101-1106.
- Koul, O., 1995. Acorus allelochemical: Chemistry and bioefficacy against insects. Pesticides, Crop Protection and Environment, Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi, 99-113.
- Koul, O., Smirle, M.J., Isman, M.B., 1990. Asarones from *Acorus calamus* L. Oil : Their effect on feeding behavior and dietary utilization in *Peridroma saucia*. Journal of Chemical Ecology 16, 1911-1920.
- Lacey, L.A., Frutos, R., Kaya, H.K., Vail, P., 2001. Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future? Biological Control 21, 230-248.
- Landolt, P., Gonzalez, M., Chambers, D., Heath, R., 1991. Comparison of field observations and trapping of papaya fruit fly in papaya plantings in Central America and Florida. Florida Entomologist, 408-414.
- Landolt, P.J., Hendrichs, J., 1983. Reproductive behavior of the papaya fruit fly, *Toxotrypana curvicauda* Gerstaecker (Diptera: Tephritidae). Annals of the Entomological Society of America 76, 413-417.
- Lecadet, M.M., Frachon, E., Dumanoir, V.C., Ripouteau, H., Hamon, S., Laurent, P., Thierry, I., 1999. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. Journal of Applied Microbiology 86, 660-672.
- Ledermann, W., 2003. *Bacillus anthracis*: una larga historia de terror. Revista Chilena de Infectología 20, 28-31.

- Lee, B.-H., Choi, W.-S., Lee, S.-E., Park, B.-S., 2001. Fumigant toxicity of essential oils and their constituent compounds towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L.). Crop Protection 20, 317-320.
- Lee, S., Peterson, C.J., Coats, J.R., 2003. Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. Journal of Stored Products Research 39, 77-85.
- Lee, S., Tsao, R., Peterson, C., Coats, J.R., 1997. Insecticidal Activity of Monoterpenoids to Western Corn Rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae), Twospotted Spider Mite (Acari: Tetranychidae), and House Fly (Diptera: Muscidae). Journal of Economic Entomology 90, 883-892.
- Li, J., Derbyshire, D., Promdonkoy, B., Ellar, D., 2001. Structural implications for the transformation of the *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins from water-soluble to membrane-inserted forms. Biochemical Society Transactions 29, 571-577.
- Lichtenstein, E.P., Liang, T.T., Schulz, K.R., Schnoes, H.K., Carter, G.T., 1974. Insecticidal and synergistic components isolated from dill plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry 22, 658-664.
- Lightwood, D.J., Ellar, D.J., Jarrett, P., 2000. Role of Proteolysis in Determining Potency of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac δ -Endotoxin. Applied and Environmental Microbiology 66, 5174-5181.
- Liquido, N.J., 1992. Effect of fruit screening method on estimating number of oriental fruit flies, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae), in host fruit: Proceedings of the Hawaiian Entomological Society 31: 171-176.
- Lord, J.C., 2005. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: the path of microbial control. Journal of Invertebrate Pathology 89, 19-29.
- Lu, H., Rajamohan, F., Dean, D.H., 1994. Identification of amino acid residues of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIAa associated with membrane binding and toxicity to *Bombyx mori*. Journal of Bacteriology 176, 5554-5559.
- Maciel, M.V., Morais, S.M., Bevilaqua, C.M., Silva, R.A., Barros, R.S., Sousa, R.N., Sousa, L.C., Brito, E.S., Souza-Neto, M.A., 2010. Chemical composition of *Eucalyptus* spp. essential oils and their insecticidal effects on *Lutzomyia longipalpis*. Veterinary Parasitology 167, 1-7.
- Mahesh Kumar, P., Murugan, K., Kovendan, K., Subramaniam, J., Amaresan, D., 2012. Mosquito larvicidal and pupicidal efficacy of *Solanum xanthocarpum* (Family: Solanaceae) leaf extract and bacterial insecticide, *Bacillus thuringiensis*, against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). Parasitol Res 110, 2541-2550.

Malo, E.A., Zapien, G.I., 1994. McPhail trap captures of *Anastrepha obliqua* and *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) in relation to time of day. The Florida Entomologist 77, 290-294.

Marcus, C., Lichtenstein, E.P., 1979. Biologically active components of anise: toxicity and interactions with insecticides in insects. Journal of Agricultural and Food Chemistry 27, 1217-1223.

Mareggiani, G., 2001. "Manejo de insectos plaga mediante sustancias semioquímicas de origen vegetal". Manejo integrado de Plagas 60: 22-30.

Martin, P.A.W., Travers, R.S., 1989. Worldwide Abundance and Distribution of *Bacillus thuringiensis* Isolates. Applied and Environmental Microbiology 55, 2437-2442.

Martinez-Velazquez, M., Castillo-Herrera, G.A., Rosario-Cruz, R., Flores-Fernandez, J.M., Lopez-Ramirez, J., Hernandez-Gutierrez, R., Lugo-Cervantes Edel, C., 2011. Acaricidal effect and chemical composition of essential oils extracted from *Cuminum cyminum*, *Pimenta dioica* and *Ocimum basilicum* against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). Parasitology Research 108, 481-487.

Martinez, A.J., Moreno, D.S., 1991. Effect of cyromazine on the oviposition of Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) in the laboratory. Journal of Economic Entomology 84, 1540-1543.

Martinez, A.J., Robacker, D.C., Garcia, J.A., 1997. Toxicity of an isolate of *Bacillus thuringiensis* subspecies *darmstadensis* to adults of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) in the laboratory. Journal of Economic Entomology 90, 130-134.

Meadows, M.P., Ellis, D.J., Butt, J., Jarrett, P., Burges, H.D., 1992. Distribution, Frequency, and Diversity of *Bacillus thuringiensis* in an Animal Feed Mill. Applied and Environmental Microbiology 58, 1344-1350.

Messing, R.H. (1996). Status and needs of biological control researcher for tephritia flies. En Bruce A. McPherson y Gary J. Steck (Eds.). Fruit fly pest: a world assessment of their biology and management (pp. 365-369). FLorida, USA: Lucie Press.

Metcalf, R.L., Luckman, W.H., 1994. Introducción al manejo integrado de plagas de insectos. Noriega eds. México 710 pp.

Molina, C.A., Caña-Roca, J.F., Osuna, A., Vilchez, S., 2010. Selection of a *Bacillus pumilus* strain highly active against *Ceratitis capitata* (Wiedemann) larvae. Applied and Environmental Microbiology 76, 1320-1327.

Moreno, P.R.H., Lima, M.E.L., Sobral, M., Young, M.C.M., Cordeiro, I., Apel, M.A., Limberger, R.P., Henriques, A.T., 2007. Essential oil composition of fruit colour varieties of *Eugenia brasiliensis* Lam. Scientia Agricola 64, 428-432.

Naimov, S., Boncheva, R., Karlova, R., Dukiandjiev, S., Minkov, I., de Maagd, R.A., 2008. Solubilization, activation, and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* serovar *thompsoni* HD542 crystal proteins. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 7145-7151.

Ngoh, S.P., Choo, L.E.W., Pang, F.Y., Huang, Y., Kini, M.R., Ho, S.H., 1998. Insecticidal and repellent properties of nine volatile constituents of essential oils against the American cockroach, *Periplaneta americana* (L.). *Pesticide Science* 54, 261-268.

Norrbom, A.L., Foote, R.H., 1989. The taxonomy and zoogeography of the Genus *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). En Robinson A.S. y Hooper (Eds.). *Fruit flies, their biology, natural enemies and control* (pp.15-16). Amsterdam: Elsevier.

Norrbom, A.L., Kim, K.C., 1988. A list of the reported host plants of the species of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). U.S. Department of Agriculture (APHIS -PPQ) 81-52: 1-114.

Novan A. 1992. Interaction among herbivores microbial insecticides and crop plants. *Phytoparasitica*, 20 (Edição suplementar).

Obeng-Ofori, D., Reichmuth, C., 1997. Bioactivity of eugenol, a major component of essential oil of *Ocimum suave* (Wild.) against four species of stored-product Coleoptera. *International Journal of Pest Management* 43, 89-94.

Ohba, M., Aizawa, K., 1986. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in Soils of Japan. *Journal of Invertebrate Pathology* 47, 277-282.

Ohba, M., Aratake, Y., 1994. Comparative-Study of the Frequency and Flagellar Serotype Flora of *Bacillus thuringiensis* in Soils and Silkworm-Breeding Environments. *Journal of Applied Bacteriology* 76, 203-209.

Papachristos, D.P., Kimbaris, A.C., Papadopoulos, N.T., Polissiou, M.G., 2009. Toxicity of citrus essential oils against *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) larvae. *Annals of Applied Biology* 155, 381-389.

Pavela, R., 2004a. Insecticidal activity of certain medicinal plants. *Fitoterapia* 75, 745-749.

Pavela, R., 2004b. Repellent effect of ethanol extracts from plants of the family Lamiaceae on Colorado Potato Beetle adults (*Leptinotarsa decemlineata* Say). *National Academy Science Letters* 27, 195-203.

Pavela, R., 2005. Insecticidal activity of some essential oils against larvae of *Spodoptera littoralis*. *Fitoterapia* 76, 691-696.

Pavela, R., 2006. Insecticidal Activity of Essential Oils Against Cabbage Aphid *Brevicoryne brassicae*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 9, 99-106.

- Pavela, R., 2009. Larvicidal property of essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Industrial Crops and Products* 30, 311-315.
- Pavela, R., Harmatha, J., Banert, M., Vokac, K., 2005. Systemic effects of phytoecdysteroids on the cabbage aphid *Brevicoryne brassicae* (Sternorrhyncha: Aphididae). *European Journal of Entomology* 102, 647.
- Pavela, R., Vrchotova, N., Triska, J., 2009. Mosquitocidal activities of thyme oils (*Thymus vulgaris* L.) against *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research* 105, 1365-1370.
- Pettersson, B., Rippere, K.E., Yousten, A.A., Priest, F.G., 1999. Transfer of *Bacillus lentimorbus* and *Bacillus popilliae* to the genus *Paenibacillus* with emended descriptions of *Paenibacillus lentimorbus* comb. nov. and *Paenibacillus popilliae* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49 Pt 2, 531-540.
- Piedra, E., Zuniga, A., Aluja, M., 1993. New host plant and parasitoid record in Mexico for *Anastrepha alveata* Stone (Diptera: Tephritidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington (USA)*. 95:127.
- Pimentel, D., Glenister, C., Fast, S., Gallahan, D., 1984. Environmental Risks of Biological Pest Controls. *Oikos* 42, 283-290.
- Polanczyk RA, Alves SB. 2005. Interação entre *Bacillus thuringiensis* e outros entomopatógenos no controle de *Spodoptera frugiperda*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 74: 24-33.
- Priest, F.G., 1989. Isolation and identification of aerobic endospore-forming bacteria, *Bacillus*. Springer, pp. 27-56. In C. Hardwood [ed.], *Biotechnology Handbook 2: Bacillus*. Plenum Press, New York.
- Priest, F.G., 2000. Biodiversity of the entomopathogenic, endospore-forming bacteria, pp. 16. In J. F. Charles, A. Delaecluse and C. L. Roux [eds.], *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Priest, F.G., Goodfellow, M., Todd, C., 1988. A numerical classification of the genus *Bacillus*. *Journal of General Microbiology* 134, 1847-1882.
- Priestley, C.M., Williamson, E.M., Wafford, K.A., Sattelle, D.B., 2003. Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABA(A) receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. *British Journal of Pharmacology* 140, 1363-1372.
- Qaim M., Zilberman D. 2003. Yield effects of genetically modified crops in developing countries. *Science*; 299:900–902.

- Raal, A., Orav, A., Arak, E., 2007. Composition of the essential oil of *Salvia officinalis* L. from various European countries. *Natural Product Research* 21, 406-411.
- Raymond, B., Davis, D., Bonsall, M.B., 2007. Competition and reproduction in mixed infections of pathogenic and non-pathogenic *Bacillus* spp. *Journal of Invertebrate Pathology* 96, 151-155.
- Raymond, B., Johnston, P.R., Wright, D.J., Ellis, R.J., Crickmore, N., Bonsall, M.B., 2009. A mid-gut microbiota is not required for the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* to diamondback moth larvae. *Environmental Microbiology* 11, 2556-2563.
- Raymond, B., Lijek, R.S., Griffiths, R.I., Bonsall, M.B., 2008. Ecological consequences of ingestion of *Bacillus cereus* on *Bacillus thuringiensis* infections and on the gut flora of a lepidopteran host. *Journal of Invertebrate Pathology* 99, 103-111.
- Raymond, B., Wyres, K.L., Sheppard, S.K., Ellis, R.J., Bonsall, M.B., 2010. Environmental factors determining the epidemiology and population genetic structure of the *Bacillus cereus* group in the field. *PLoS pathogens* 6, e1000905.
- Revina, L.P., Zalunin, I.A., Krieger, I.V., Tulina, N.M., Wojciechowska, Y.A., Levitin, E.I., Chestukhina, G.G., Stepanov, V.M., 1999. Two types of entomocidal crystals of *Bacillus thuringiensis* ssp. *finitimus* have the same set of unique delta-endotoxins. *Biochemistry. Biokhimiia* 64, 1122-1127.
- Rice, P.J., Coats, J.R., 1994. Insecticidal properties of several monoterpenoids to the house fly (Diptera: Muscidae), red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae), and southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology* 87, 1172-1179.
- Robacker, D.C., Martinez, A.J., Garcia, J.A., Diaz, M., Romero, C., 1996. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology* 89, 104-110.
- Robacker, D.C., Moreno, D.S., Wolfenbarger, D.A., 1990. Effects of trap color, height, and placement around trees on capture of Mexican fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology* 83, 412-419.
- Rocha-Peña, M.A., y Padrón-Chávez, J.E. (Eds.). 2009. El cultivo de los cítricos en el estado de Nuevo León. Libro Científico No. 1. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. CIRNE. Campo Experimental General Terán. México.
- Roh, J.Y., Choi, J.Y., Li, M.S., Jin, B.R., Je, Y.H., 2007. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 17, 547-559.
- Romoser, W., Stoffolano, J.G., Jr (eds). 1998. The science of entomology. 4th ed. WCB McGraw-Hill. Boston, MA, EUA. 605 pp.

- Sabbour MM. 2003. Combined effects of some microbial control agents mixed with botanical extracts on some stored product insects. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 6(1): 51-56.
- Sadek, M.M., 2003. Antifeedant and toxic activity of *Adhatoda vasica* leaf extract against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). *Journal of Applied Entomology* 127, 396-404.
- Saito ML, Lucchini F. 1998. Substâncias obtidas de plantas e a procura por praguicidas eficientes e seguros ao meio ambiente. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA. 46p.
- Sánchez-Yáñez, J., Peña-Cabriales, J., 1995. Sobrevivencia de Esporas de *Bacillus thuringiensis* en el Filoplano de Maíz, de Frijol y en el Suelo, International Microbial Ecology Meeting. Ciudad de México.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dean, D.H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 775-+.
- Sharda, S., Rao, P.J., 2000. Effect of *Ageratum conyzoides* on development and reproduction of *Spodoptera litura*. *Indian Journal of Entomology* 62, 231-238.
- Sharma, S., Gill, K., Malik, M., Malik, O., 2000. Insecticidal, antifeedant and growth inhibitory activities of essential oils of some medicinal plants. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences* 22, 373-377.
- Shea, K., Possingham, H.P., 2000. Optimal release strategies for biological control agents: an application of stochastic dynamic programming to population management. *Journal of Applied Ecology* 37, 77-86.
- Shelton, A.M., Zhao, J.Z., Roush, R.T., 2002. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of bt transgenic plants. *Annual Review of Entomology* 47, 845-881.
- Shen, Z., Qu, W., Wang, W., Lu, Y., Wu, Y., Li, Z., Hang, X., Wang, X., Zhao, D., Zhang, C., 2010. MPprimer: a program for reliable multiplex PCR primer design. *BMC Bioinformatics* 11, 143.
- Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K., Komagata, K., 1996. Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46, 939-946.
- Shorey, H.H., Hale, R.L., 1965. Mass-Rearing of the Larvae of Nine Noctuid Species on a Simple Artificial Medium. *Journal of Economic Entomology* 58, 522-524.
- Sivinski, J., 1990. Colored Spherical Traps for Capture of Caribbean Fruit Fly, *Anastrepha suspensa*. *The Florida Entomologist* 73, 123-128.

Sivinski, J., Calkins, C., Baranowski, R., Harris, D., Brambila, J., Diaz, J., Burns, R., Holler, T., Dodson, G., 1996. Suppression of a Caribbean Fruit Fly (*Anastrepha suspensa* Loew (Diptera: Tephritidae) Population through Augmented Releases of the Parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* Ashmead (Hymenoptera: Braconidae). *Biological Control* 6, 177-185.

Smirnova, T.A., Minenkova, I.B., Orlova, M.V., Lecadet, M.M., Azizbekyan, R.R., 1996. The crystal-forming strains of *Bacillus laterosporus*. *Research in Microbiology* 147, 343-350.

Smith, R.A., Couche, G.A., 1991. The Phylloplane as a Source of *Bacillus thuringiensis* Variants. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 311-315.

Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1981. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. San Francisco: W H Freeman.

Steyskal, G.C., 1977. History and Use of the McPhail Trap. *The Florida Entomologist* 60, 11-16.

Stroh, J., Wan, M., Isman, M., Moul, D., 1998. Evaluation of the acute toxicity to juvenile Pacific coho salmon and rainbow trout of some plant essential oils, a formulated product, and the carrier. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 60, 923-930.

Strong, D.R., Pemberton, R.W., 2000. Biological control of invading species risk and reform. *Science* 288, 1969-1970.

Tchoumboungang, F., Dongmo, P.M.J., Sameza, M.L., Mbanjo, E.G.N., Fotso, G.B.T., Zollo, P.H.A., Menut, C., 2009. Activité larvicide sur *Anopheles gambiae* Giles et composition chimique des huiles essentielles extraites de quatre plantes cultivées au Cameroun. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 13 (1) (2009), pp. 77–84.

Todar, K. 2006. The genus *Bacillus*. In: *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. University of Wisconsin-Madison, Department of Bacteriology., Madison.

Toenniessen G.H., O'Toole J.C., DeVries J. 2003. Advances in plant biotechnology and its adoption in developing countries. *Curr Op in Plant Biol*;6:191–198.

Toledo, J., 1993. Intensive gathering of potential fruit fly hosts to obtain biological material and as a cultural control method. En M. Aluja y P. Liedo (Eds). *Fruit flies: Biology and Management* (pp. 381-385). New York: Springer Verla, Inc.

Toledo, J., Liedo, P., Williams, T., Ibarra, J., 1999. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* beta-exotoxin to three species of fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology* 92, 1052-1056.

- Traboulsi, A.F., Taoubi, K., el-Haj, S., Bessiere, J.M., Rammal, S., 2002. Insecticidal properties of essential plant oils against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae). *Pest Management Science* 58, 491-495.
- Travers, R.S., Martin, P.A., Reichelderfer, C.F., 1987. Selective Process for Efficient Isolation of Soil *Bacillus* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 1263-1266.
- Tripathi, A., Prajapati, V., Aggarwal, K., Kumar, S., Kumar, S., Kukreja, A., Dwivedi, S., Singh, A., 2000. Effect of volatile oil constituents of *Mentha* species against the stored grain pests, *Callosobruchus maculatus* and *Tribolium castaneum*, *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences. Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants*, 22, 549-556.
- Tripathi, A.K., Prajapati, V., Kumar, S., 2003. Bioactivities of l-carvone, d-carvone, and dihydrocarvone toward three stored product beetles. *Journal of Economic Entomology* 96, 1594-1601.
- Turnbull, P.C., Kramer, J.M., 1983. Non-gastrointestinal *Bacillus cereus* infections: an analysis of exotoxin production by strains isolated over a two-year period. *Journal of Clinical Pathology* 36, 1091-1096.
- van Emden, H.F., Service M.W., 2004. *Pest and vector control*. Cambridge and New York: Cambridge University Press, Cambridge, UK, 3439 pp.
- van Frankenhuyzen, K. 2000. Application of *Bacillus thuringiensis* in forestry. In: Charles, J.F.; Delécluse, A.; Nielsen-LeRoux, C., editors. *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application*. Kluwer Academic Publishers; p. 371
- Vidal-Quist, J.C., Castanera, P., Gonzalez-Cabrera, J., 2009. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from citrus orchards in Spain and evaluation of their insecticidal activity against *Ceratitis capitata*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19, 749-759.
- Villeda, M., Hendrichs, J., Aluja, M., Reyes, J., 1988. Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*: Behavior in nature in relation to different Jackson traps. *Florida Entomologist*, 154-162.
- Vrushali, T., Tare, V., Shushil, K., 2001. Bioactivity of some medicinal plants against chosen insect pests/vectors, In K. Sushil, S.A. Hasan, D. Samresh, A.K. Kukreja, S. Ashok, A.K. Sharma, S. Srikant and T. Rakesh (eds.), *Proceedings of the National Seminar on the Frontiers of Research and Development in Medicinal Plants*, CIMAP, Lucknow, pp.
- Wheeler, D.A., Isman, M.B., 2001. Antifeedant and toxic activity of *Trichilia americana* extract against the larvae of *Spodoptera litura*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 98, 9-16.

Whiteley, H.R., Schnepf, H.E., 1986. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. Annual Review of Microbiology 40, 549-576.

Zaridah, M., Nor Azah, M., Abu Said, A., Mohd Faridz, Z., 2003. Larvicidal properties of citronellal and *Cymbopogon nardus* essential oils from two different localities. Trop Biomed 20, 169-174.

Zhao, B., Grant, G.G., Langevin, D., MacDonald, L., 1998. Deterring and Inhibiting Effects of Quinolizidine Alkaloids on Spruce Budworm (Lepidoptera: Tortricidae) Oviposition. Environmental Entomology 27, 984-992.